

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年9月22日 (22.09.2005)

PCT

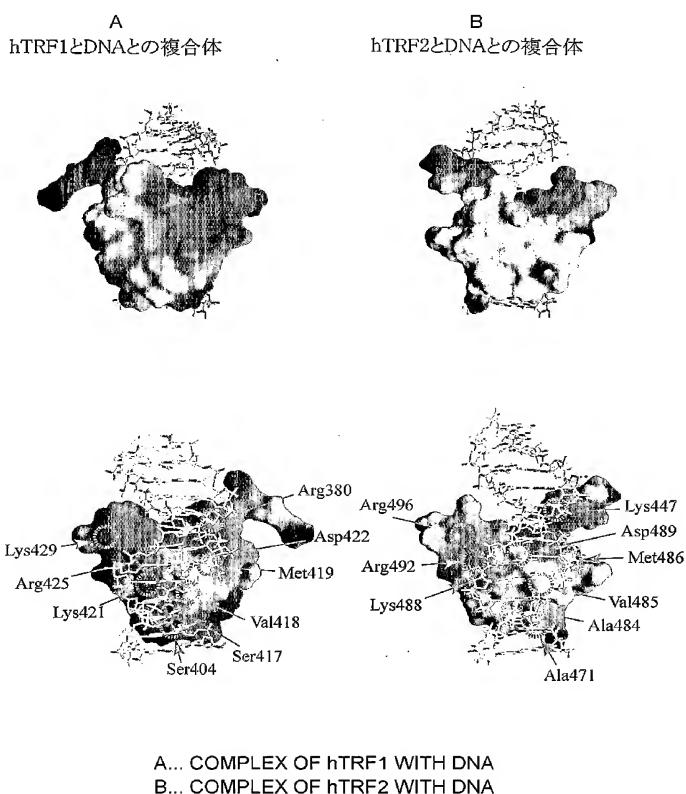
(10)国際公開番号
WO 2005/086595 A2

- (51)国際特許分類: 分類無し
(21)国際出願番号: PCT/JP2005/003237
(22)国際出願日: 2005年2月21日 (21.02.2005)
(25)国際出願の言語: 日本語
(26)国際公開の言語: 日本語
(30)優先権データ:
特願2004-046238 2004年2月23日 (23.02.2004) JP
(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人木原記念横浜生命科学振興財団 (KIHARA MEMORIAL YOKOHAMA FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF LIFE SCIENCES) [JP/JP];
〒2440813 神奈川県横浜市戸塚区舞岡町641-12 Kanagawa (JP). 公立大学法人横浜市立大学 (YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22番2号 Kanagawa (JP).
- (72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 西村 善文 (NISHIMURA, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒1810013 東京都三鷹市下連雀2-20-6 Tokyo (JP). 花岡 慎悟 (HANAKA, Shingo) [JP/JP]; 〒3340058 埼玉県川口市安行領家102-3 Saitama (JP).
(74)代理人: 間山 世津子, 外 (MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機会館4階 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: TELOMERE PROTEIN TRF2 DNA-BINDING DOMAIN MUTANT PROTEIN, TELOMERE DNA MUTANT AND UTILIZATION OF COMPLEX STRUCTURE OF TRF2 DNA-BINDING DOMAIN WITH DOUBLE-STRANDED DNA

(54)発明の名称: テロメアタンパク質TRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質、テロメアDNA変異体及びTRF2 DNA結合ドメインと二重らせんDNAとの複合体構造の利用



(57) Abstract: A TRF2 DNA-binding domain mutant protein represented by the following (a) or (b) or its salt. (a) A protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of wild type hTRF2 DNA-binding domain by at least one substitution selected from among the substitution of lysine at the 10-position into arginine, the substitution of alanine at the 34-position into serine, the substitution of alanine at the 47-position into serine and the substitution of arginine at the 59-position into lysine. (b) A protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of the protein of the above (a) by deletion, substitution or addition of one to several amino acids other than the amino acid at the 10-position, the amino acid at the 34-position, the amino acid at the 47-position and the amino acid at the 59-position, and being superior in the ability to bind to a double-stranded DNA containing a sequence represented by 5'-TTAGGG-3' to wild type TRF2 DNA-binding domain having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2.

(57)要約: 以下の(a)又は(b)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。(a)野生型hTRF2のDNA結合ドメインのアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換が

[続葉有]

WO 2005/086595 A2



(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書なし; 報告書を受け取り次第公開される。

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

テロメアタンパク質TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質、テロメアDNA変異体及びTRF2DNA結合ドメインと二重らせんDNAとの複合体構造の利用

技術分野

本発明は、テロメアタンパク質TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質、テロメアDNA変異体及びTRF2DNA結合ドメインと二重らせんDNAとの複合体構造の利用に関する。

背景技術

脊椎動物の染色体末端はテロメアと呼ばれGG配列に富んだ繰り返しDNAとタンパク質から構成されている。哺乳類のテロメア末端はテロメアDNA結合タンパク質TRF1及びTRF2とそれらと相互作用するタンパク質などで構成されており、2本鎖DNA損傷末端の監視機構からの認識を免れている（非特許文献1～3）。最近、テロメアタンパク質TRF2が機能的テロメア構造を形成するうえで、重要な役割を担っていることを裏付ける報告が数多く提示してきた。TRF2は全長500個のアミノ酸からなり、N末には420残基からなる2量体形成ドメイン、C末には60残基からなるDNA結合ドメインが存在する。相同性の高いテロメアDNA結合タンパク質TRF1は439アミノ酸からなり同様にN末側に2量体形成ドメイン、C末にDNA結合ドメインが存在し、各ドメインの相同性は非常に高いが、2量体形成ドメインの前の約50アミノ酸がTRF2では塩基性アミノ酸に富んでいるのに対し、TRF1では酸性アミノ酸に富んでいる（非特許文献2～5）。このTRF1、TRF2のDNA結合ドメインは同じDNA配列(TTAGGGのタンデムなりピート配列)を認識する。しかし、in vitroでTRF1は2本鎖DNA配列を認識し、DNAを折り曲げるのに対し（非

特許文献4、6及び7)、TRF2は2本鎖DNAと3' 突出末端の接合部位に優先的に結合しt-loop構造をとらせる(非特許文献8)。t-loopとは3' 突出末端が内側の2本鎖部分のテロメア配列に入り込んで、その反対側のテロメア配列と2本鎖を形成することによって、作られるループ構造でありt-loop内ではその接合部位にTRF2が結合している(非特許文献9)。このTRF2のテロメアDNAへの結合を阻害するだけで、染色体の不安定性ならびにp16/RB系を介した老化やATM/p53系を介したアポトーシスによる細胞死を誘導する(非特許文献10~13)。つまりTRF1とTRF2へのDNA結合様式には大きな違いがあり、テロメア結合分子は単にテロメア配列に結合するのではなく、テロメア末端の3次元的な構造変化を引き起こすことによって機能的なテロメア構造を形成しているのではないかと考えられている(非特許文献9)。DNA結合タンパク質であるTRF1とTRF2のDNA結合ドメインの相同性は約60%と高く、同じ配列を認識している。TRF1とTRF2のDNA結合ドメインの配列は癌原遺伝子産物c-Myb(非特許文献14、15)のDNA結合ドメインの3つの各リピート配列との相同性が高いことが知られている。c-MybのDNA結合ドメインはR1, R2, R3と呼ばれる53残基からなるリピート配列から成っており、各リピートは3本ヘリックスから形成されている。TRF1のDNA結合ドメインは以前報告され、c-Myb同様3つのヘリックスから成っており3番目のヘリックスがDNAの主溝に深く入ることでDNAに結合する(非特許文献16)。TRF2のDNA結合ドメインの配列はTRF1でのDNAの認識に関わるアミノ酸はほとんど保存されており、TRF1同様のDNAへの結合様式を取ると考えられる。このTRF2とDNAとの複合体の構造やその性質を調べ、TRF1との違いを調べることはテロメアの染色体末端の保護機構を調べる上で大変に重要である。

【非特許文献1】

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T. & Gilson, E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* 17, 236-239. (1997)

【非特許文献 2】

Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17, 231-235. (1997)

【非特許文献 3】

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. & de Lange, T. A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667. (1995)

【非特許文献 4】

Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de Lange, T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* 16, 1785-1794. (1997)

【非特許文献 5】

Smith, S. & de Lange, T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet.* 13, 21-26. (1997)

【非特許文献 6】

Bianchi, A.M., Stansel, R.M., Fairall, L.D., Griffith, J.D., Rhodes, D. & de Lange, T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J.* 18, 5735-5744. (1999)

【非特許文献 7】

Griffith, J., Bianchi, A. & de Lange, T. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J. Mol. Biol.* 278, 79-88. (1998)

【非特許文献 8】

Stansel, R.M., de Lange, T. & Griffith, J.D. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 20, E5532-E5540. (2001)

【非特許文献 9】

Griffith, J. D., Comenau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianch, A., Moss, H. & de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514. (1999)

【非特許文献 10】

Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449. (2002)

【非特許文献 11】

van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusion. *Cell* 92, 401-413. (1998)

【非特許文献 12】

Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21, 4338-4348. (2002)

【非特許文献 13】

Kalseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325. (1999)

【非特許文献 14】

Gonda, T. J., Gough, N. M., Dunn, A. R. & de Blaquiere, J. Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *EMBO J.* 4, 2003-2008. (1985)

【非特許文献 15】

Klempnauer, K. H. & Sippel, A. E. The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* 6, 2719-2725. (1987)

【非特許文献 16】

Nishikawa, T., Okamura, H., Nagadoi, A., Konig, P., Rhodes, D. & Nishimura,

Y. Solution structure of a telomere DNA complex of human TRF1. *Structure*
9, 1237-1251. (2001)

本発明は、テロメアタンパク質TRF2DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造とその機能を解析することを目的とする。

また、本発明は、これらの解析結果により、TRF2のDNAへの結合能を調節できる薬剤のスクリーニングを可能とし、TRF2をターゲットにした創薬に貢献することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、テロメアタンパク質TRF2DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造をNMR法で決定した。以前に報告されているテロメアタンパク質TRF1とテロメア二重らせんDNAとの複合体の構造(Nishikawa, T., Okamura, H., Nagadoi, A., Konig, P., Rhodes, D. & Nishimura, Y. Solution structure of a telomere DNA complex of human TRF1. *Structure* 9, 1237-1251. (2001))と比較して、TRF2とTRF1の二重鎖DNAに対する認識様式を比較した。TRF1とTRF2のアミノ酸は約40% (TRF1とTRF2の相同性はidentityで約60%ある。)異なるが、構造比較の結果、TRF2の4個のアミノ酸のみをTRF1型に置換することによって、TRF2のDNA結合能をTRF1型に変換することに成功した。すなわち、TRF2のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体を作製することができた。本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 以下の(a)又は(b)のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、10 位のアミノ酸、34 位のアミノ酸、47 位のアミノ酸及び 59 位のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん DNA への結合能が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する野生型 TRF2 DNA 結合ドメインよりも高いタンパク質

(2) (a) のタンパク質が以下の (ia) ~ (via) のいずれかのタンパク質である

(1) 記載の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iiia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iva) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(va) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(via) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(vii a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(viiia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

- (3) (1) 記載のタンパク質をコードする DNA。
- (4) (3) 記載の DNA を含有する組換えベクター。
- (5) (4) 記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- (6) (3) 記載の DNA で形質転換した宿主を培養し、培養物から TRF 2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を採取することを含む TRF 2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質の製造方法。
- (7) (1) 記載の TRF 2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。
- (8) (1) 記載の TRF 2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質又はその塩。
- (9) (1) 又は (8) 記載のタンパク質と DNA との複合体。
- (10) 配列番号 17 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換、7 番目の G から C への置換及び 9 番目の T から G への置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされている塩基配列を有する DNA。
- (11) 以下の (ib) ~ (iib) のいずれかの DNA である (10) 記載の DNA。
 - (ib) 配列番号 17 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する DNA
 - (iib) 配列番号 17 の塩基配列において、7 番目の G から C への置換がなされている塩基配列を有する DNA

(iiib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、9 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する DNA

(12) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する TRF2 DNA 結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10 位のリシン、34 位のアラニン、47 位のアラニン及び 59 位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合には、被験物質がテロメア DNA と TRF2 との結合を制御することができると判定することを含む、テロメア DNA と TRF2 との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法。

(13) 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん DNA の存在下で、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する TRF2 DNA 結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10 位のリシン、34 位のアラニン、47 位のアラニン及び 59 位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析する (12) 記載の方法。

本明細書において、「TRF2」とは、哺乳類のテロメア' TTAGGG' 繰り返し配列に特異的に結合する 500 アミノ酸からなるタンパク質であり、N 末端に塩基性領域、中央部に 2 量体形成ドメイン、C 末端に DNA 結合ドメインから構成されているものをいう。

「TRF2 DNA 結合ドメイン」とは、TRF2 の C 末端部位にある約 60 アミノ酸からなる領域をいう。その領域のみで DNA への結合が可能である。

「変異体タンパク質」とは、基準となるタンパク質と異なるが、基準となるタンパク質の不可欠な性質を保持しているタンパク質を意味する。典型的な変異体タンパク質は、基準となるタンパク質とアミノ酸配列が相違する。

5' -TTAGGG-3' は、哺乳類のテロメア DNA の二重鎖 DNA の繰り返し配列であり、ここに特異的なタンパク質（例えば、出芽酵母の Rap1、分裂酵母の Taz1p、

コメの RTBP1、哺乳類で見つかっている TRF1 および TRF2) が結合する。

5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。

tr13: 5' -GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号 17) / 5' -CCCTAACCTAAC - 3' (配列番号 18)

TRF2 DNA結合ドメイン又はその変異体タンパク質の 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能は、後述の実施例に示すような表面プラズマ共鳴により測定することができる。

「テロメアDNA」とは、脊椎動物の染色体末端のDNAはGに富んだ繰り返し配列とそのDNAに結合するタンパク質で構成されているテロメアと呼ばれる領域があるが、この繰り返しDNA配列がテロメアDNAである。

「抗体」とは、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に誘導されるタンパク質で、免疫原(抗原)と特異的に結合する活性を有するものを意味し、これには、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらには、Fab又はFabフラグメントなどが含まれる。

「相互作用」とは、2つ以上の物体(例えば、原子、分子)の間に力が働きあうことをいう。相互作用としては、親水性の相互作用(例えば、水素結合、塩橋)、疎水性の相互作用(例えば、疎水結合)、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用などを例示することができる。

本発明により、TRF2のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体が提供された。

また、本発明により、テロメアタンパク質TRF2DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造とその機能が解析され、TRF2のDNAへの結合能を調節できる薬剤のスクリーニングが可能となった。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願 2004-46238

号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1 (a) は、主な Myb ドメインを含むテロメアタンパク質と c-Myb のドメイン構造の概要図を示す。 basic : 塩基性ドメイン、 acidic : 酸性ドメイン、 TRFH : TRF ホモロジードメイン、 BRCT : BRCA1 ホモロジードメイン、 RCT : Rap1 C 末端ホモロジードメイン、 active : 転写活性化ドメイン、 negative regulation : 転写抑制ドメイン、 Myb : Myb ホモロジードメイン、 DNA binding : DNA 結合能がある Myb 領域

図1 (b) は、主なテロメアタンパク質の Myb ドメインと c-Myb の各リピート (R1、 R2、 R3) のアミノ酸配列を示す。アンダーラインはヘリックス領域を示している。また点線は分子内の架橋を形成している残基を繋いだ。

図2 (a) は、 TRF2-DBD のステレオ図を示す。上は 25 個の中で最もエネルギーの低い構造であり、下は 25 個の重ね書きである。

図2 (b) は、 TRF2-DBD と DNA との複合体のステレオ図を示す。(a) は 20 個の中で最もエネルギーの低い構造であり、(b) は 20 個の重ね書きである。

図3 (a) は、 NMR で決定した構造から得られた TRF1 と TRF2 の DNA への認識模式図を示す。矢印は静電的な相互作用を示し、点線での矢印は疎水性の相互作用を示す。

図3 (b) は、 TRF1 と TRF2 の静電分布図を示す。青が正電荷、赤が負電荷を帯びている。表示したアミノ酸は DNA の認識に関わる残基で、赤で表示したのが TRF1 と TRF2 で異なるアミノ酸を示す。

図4 は、 TRF2 の主溝の認識を示す。点線の円で囲まれた部位は T3、Val485、

Ala484 で形成される疎水性の相互作用。Asp489 と C7' , C8' を結ぶ線は水素結合を示す。

図 5 (a) は、TRF1 と TRF2 の副溝を認識する模式図を示す。上の値は Arg380 の N1、N2 と T9 の O2、A6' の N3 の距離(オングストローム)と、Lys447 と T9 の O2、A6' の N3 の距離(オングストローム)を示している。また下の括弧内は得られた 20 個の構造のうち N-H · · D (O or N) : H · · D distance < 2.7 オングストローム; N · · D distance < 3.4 オングストローム; N-H-D angle > 90° を満たす位置関係にある数を示した。

図 5 (b) は、TRF1 と TRF2 の Ser404/Ala471 と Ser417/Ala484 と T3 のリン酸骨格との相互作用を示した。線は水素結合を示している。

図 6 (a) は、TRF2 の各 DBD と tr13 (5' -d(GTTAGGGTAGGG)) のモル濃度が 1:1 のときの DNA のイミノプロトン領域のシグナルを示す。シグナルに各イミノプロトンを表記した。顕著に変化した T8, T9 を円で示した。

図 6 (b) は、図 6(a) で得られた変異体のイミノプロトンの化学シフトの値から野生型を引いた値のグラフを示す。

図 7 は、SPR で得られた TRF2、各 DBD の解離定数 (KD) を tr13、T3G、G7C、T9G についてのグラフを示す。

図 8 は、構造が登録されているホメオドメインのアミノ酸のアライメントを示す。保存されている疎水性のアミノ酸を黄色(実線枠)、5 番目のアミノ酸をシアン(点線枠)で囲った。

発明を実施するための最良の形態

1. TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質

本発明は、以下の (a) 又は (b) の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を提供する。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、10 位のアミノ酸、34 位のアミノ酸、47 位のアミノ酸及び 59 位のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん DNA への結合能が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する野生型 TRF2 DNA 結合ドメインよりも高いタンパク質

(a) の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質としては、以下の (ia) ~ (via) のタンパク質を例示することができる。

(ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iiia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(iva) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(va) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(via) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(vii a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換及び47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(vii ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換及び47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(ia) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。

(ii a) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

(iii a) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。

(iv a) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 10 に示す。

(va) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 12 に示す。

(vii a) のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 14 に示す。

(b) の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質としては、ヒト以外の生物（例えば、酵母、コメ、脊椎動物など）に由来する野生型 T R F 2 D N A 結合ドメインの変異体、配列番号 4、6、8、10、12 及び 14 のアミノ酸配列のN末端（すなわち、1位）にメチオニンが付加したアミノ酸配列を有するタンパク質などを例示することができる。

本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質は、ヒト由来の野生型 T R F 2 D N A 結合ドメインの変異体であっても、ヒト以外の生物（例えば、酵母、コメ、脊椎動物など）由来の野生型 T R F 2 D N A 結合ドメインの変異体であってもよい。

本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、公知の方法によって製造することができる。例えば、後述の 2 に記載のようにして、T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質をコードする D N A を得、得られた D N A を適当な発現ベクターに組み込んだ後、適当な宿主に導入し、組換え蛋白質として生産させることにより、T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タ

ンパク質を製造することができる（例えば、西郷薰、佐野弓子共訳、CURRENT PROTOCOLSコンパクト版、分子生物学実験プロトコール、I、II、III、丸善株式会社：原著、Ausubel, F. M. 等、Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと）。

あるいはまた、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質は公知の方法により塩の形で得ることもできる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質の塩は、薬理学的に許容される塩であるとよく、特に、薬理学的に許容される酸付加塩が好ましい。薬理学的に許容される酸付加塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などを例示することができる。

2. TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNA

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAは、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号3、5、7、9、11又は13のいずれかの塩基配列を有するDNAを例示することができる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAは、例えば、以下のようにして製造することができる。

健常なヒトの HeLa 細胞から mRNA を抽出し、逆転写酵素およびオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成する。TRF2 DNA 結合ドメインを含む領域（63 残基）を PCR によって増幅する。得られた PCR 産物が野生型 hTRF2 の DNA 結合ドメインを含む領域をコードする DNA である。野生型 hTRF2 の DNA 結合ドメインを含む領域のアミノ酸配列及びそれをコードする DNA の塩基配の一例をそれぞれ配列番号 2 及び 1 に示す。

hTRF2 の DNA 結合ドメイン変異体タンパク質をコードする DNA は、hTRF2 の DNA 結合ドメインのコード領域（63 残基）を点突然変異誘発法により変異させることにより作製することができる。変異させた hTRF2 の DNA 結合ドメインのコード領域（63 残基）を PCR によって増幅する。得られた PCR 産物が hTRF2 の DNA 結合ドメイン変異体タンパク質をコードする DNA である。配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一例を配列番号 3 に示す。配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一例を配列番号 5 に示す。配列番号 2 のアミノ酸配列において、47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一例を配列番号 7 に示す。配列番号 2 のアミノ酸配列において、59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一例を配列番号 9 に示す。配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一例を配列番号 1 に示す。配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列

を有するタンパク質をコードするDNAの塩基配列の一例を配列番号13に示す。

3. 組換えベクター

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターは、公知の方法（例えば、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法）により、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入することにより得られる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスなどを用いることができる。

発現ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

また、発現ベクターは、融合タンパク質発現ベクターであってもよい。種々の融合タンパク質発現ベクターが市販されており、pGEXシリーズ（アマシャムファルマシアバイオテク社）、pET CBD Fusion System 34b-38b (Novagen社)、pET Dsb Fusion Systems 39b and 40b (Novagen社)、pET GST Fusion System 41 and 42 (Novagen社)などを例示することができる。

4. 形質転換体

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を得るこ

とができる。

宿主としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2 細胞、Sf 細胞など）、動物細胞（例えば、CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C127 細胞、3T3 細胞、BHK 細胞、HEK293 細胞など）、植物細胞などを例示することができる。

組換えベクターを宿主に導入するには、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 に記載の方法（例えば、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、トランスペクション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、形質導入法、スクレープローディング法、ショットガン法など）または感染により行うことができる。

形質転換体を培地で培養し、培養物から TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を採取することができる。TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地から TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質が形質転換された細胞内に產生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物から TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を分離し、精製すればよい。

TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質が別のタンパク質（タグとして機能する）との融合タンパク質の形態で発現される場合には、融合タンパク質を分離及び精製した後に、FactorXa や酵素（エンテロキナーゼ）処理することにより、別のタンパク質を切断し、目的とする TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を得ることができる。

TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質の分離及び精製は、公知の方法により行うことができる。公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法

などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-PAGEアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

5. 抗体

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩の検出及び／又は定量に利用することができる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩またはそのエピトープを含む断片を動物に投与することにより得られる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体のいずれであってもよい。

ポリクローナル抗体を作製するには、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、動物に投与（免疫）を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、免疫動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。ポリクローナル抗体の分離精製は、免疫グロブリンの分離精製法（例え

ば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行なうことができる。

モノクローナル抗体は、Nature (1975) 256: 495、Science (1980) 208: 692-に記載されている、G. Kohler 及び C. Milstein のハイブリドーマ法により作製することができる。すなわち、動物を免疫した後、免疫動物の脾臓から抗体産生細胞を単離し、これを骨髄腫細胞と融合させることによりモノクローナル抗体産生細胞を調製する。さらに、インターロイキン-18 変異体タンパク質又はその塩と特異的に反応するが、他の抗原タンパク質とは実質的に交差反応しない抗体を産生する細胞系を単離するとよい。この細胞系を培養し、培養物から所望のモノクローナル抗体を取得することができる。モノクローナル抗体の精製は、上記の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

一本鎖抗体を作製する技法は、米国特許第 4,946,778 号に記載されている。

ヒト化抗体を作製する技法は、Biotechnology 10, 1121-, 1992; Biotechnology 10, 169-, 1992 に記載されている。

6. TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩の用途

本発明の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、TRF2 が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。TRF2 の DNA への結合能をなくすと、老化やアポトーシスが起こることがわかっている Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449. (2002); Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells, *EMBO J.* 21, 4338-4348. (2002); Kalseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange,

T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325. (1999) ので、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を被験体に投与する場合には、TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩を、単独で、あるいは、薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とともに、適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質及びその塩は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

7. TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質

また、本発明は、上記のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩を提供する。TRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質としては、野生型TRF2において、DNA結合ドメイン領域が本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質に置換されたものを例示することができる。野生型ヒトTRF2の塩基配列及びアミノ酸配列をそれぞれ配列番号15及び16に示す。配列番号16のアミノ酸配列において、1位から45位までがN末の塩基性ドメイン、46位から245位までが中央のTRF特異的／二量化ドメイン、438位から500位までがDNA結合ドメインである。配列番号2のアミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸配列における

438 位のグルタミン酸から 500 位のアスパラギンまでの断片である。配列番号 2 のアミノ酸配列における 10, 34, 47 及び 59 位のアミノ酸部位は、それぞれ、配列番号 1 6 のアミノ酸配列における 447, 471, 484 及び 496 位のアミノ酸部位に相当する。

本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、公知の方法によって製造することができる。例えば、T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質をコードする D N A を得、得られた D N A を適当な発現ベクターに組み込んだ後、適当な宿主に導入し、組換え蛋白質として生産させることにより、T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質を製造することができる（例えば、西郷薰、佐野弓子共訳、CURRENT PROTOCOLS コンパクト版、分子生物学実験プロトコール、I、II、III、丸善株式会社：原著、Ausubel, F. M. 等、Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York を参照のこと）。

あるいはまた、本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質は公知の方法により塩の形で得ることもできる。

本発明の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質の塩は、薬理学的に許容される塩であるとよく、特に、薬理学的に許容される酸付加塩が好ましい。薬理学的に許容される酸付加塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、マルチカルボン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などを例示

することができる。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、TRF2が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。TRF2のDNAへの結合能をなくすと、老化やアポトーシスが起こることがわかっている Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Senesecence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449. (2002) ; Smogorzewska, A. & de Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells, *EMBO J.* 21, 4338-4348. (2002) ; Kalseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325. (1999))ので、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

タンパク質の投与法は上記の通りである。

本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質及びその塩は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

8. テロメアDNA変異体

本発明は、配列番号17の塩基配列において、3番目のTからGへの置換、7番目のGからCへの置換及び9番目のTからGへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされている塩基配列を有するDNA（以下、「テロメアDNA変異体」と記すこともある。）を提供する。

本発明のテロメアDNA変異体としては、以下の(i b)～(iiib)のDNAを例示することができる。

(ib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する D N A。

(iib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、7 番目の G から C への置換がなされている塩基配列を有する D N A。

(iiib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、9 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する D N A。

(ib) の D N A の塩基配列を配列番号 1 9 に示す。

(iib) の D N A の塩基配列を配列番号 2 0 に示す。

(iiib) の D N A の塩基配列を配列番号 2 1 に示す。

本発明のテロメア D N A 変異体は、一本鎖であっても、二本鎖であっても、一部が一本鎖で残りの部分が二本鎖であるものであってもよいが、テロメア D N A の二重鎖 D N A の繰り返し配列に特異的なタンパク質（すなわち、テロメアタンパク質）との結合性の点からは、二本鎖であることが好ましい。

本発明のテロメア D N A 変異体は公知の方法で合成することができる。例えば、市販の D N A 合成機を用いて合成することができる。

本発明のテロメア D N A 変異体は、後述の実施例に示すように、テロメアタンパク質（例えば、TRF1、TRF2など）の機能解析に利用することができる。また、本発明のテロメア D N A 変異体は、テロメアタンパク質（例えば、TRF1、TRF2など）が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができると考えられる。

本発明のテロメア D N A 変異体は、疾患の予防及び／又は治療を目的とする医薬品として、あるいは、実験用の試薬として利用することができる。

9. TRF2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質と D N A との複合体

本発明は、上記の TRF2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異

体タンパク質を含むタンパク質とDNAとの複合体を提供する。

本発明の複合体を形成するタンパク質は、以下の(a)若しくは(b)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質である。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列において、10位のリシンからアルギニンへの置換、34位のアラニンからセリンへの置換、47位のアラニンからセリンへの置換及び59位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) (a)のタンパク質のアミノ酸配列において、10位のアミノ酸、34位のアミノ酸、47位のアミノ酸及び59位のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAへの結合能が配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型TRF2 DNA結合ドメインよりも高いタンパク質。

(a)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質としては、配列番号4、6、8、10、12及び14のアミノ酸配列を有するタンパク質を例示することができる。

(a)のTRF2 DNA結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質としては、野生型TRF2において、DNA結合ドメイン領域が配列番号4、6、8、10、12又は14のアミノ酸配列を有するタンパク質に置換されたものを例示することができる。野生型ヒトTRF2のアミノ酸配列を配列番号16に示す。配列番号16のアミノ酸配列において、Glu438からAsn500までがDNA結合ドメイン領域である。

本発明の複合体を形成するDNAとしては、5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAを挙げることができる。5'-TTAGGG-3'で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。

tr13: 5' -GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号 17) / 5' -CCCTAACCTAAC-3' (配列番号 18)

本発明の複合体を形成するには以下のようにするとよい。

DNA及びタンパク質は50mM以上の塩濃度、pH6.0~8.0の溶液中で30°C以下の温度で混合する。混合においてDNAに対しタンパク質を加えるようにし、タンパク質のモル比がDNAのモル比を超えないようにする。また、塩濃度を落としたいときは上記の条件で複合体を形成させたのち透析で溶液の交換をする。

複合体の形成はBiacore (Biamolecular Interaction Analysis Core technology) 装置 (Biacore社) により確認することができる。例えば、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質をセンサーチップ上に固定した後に、このセンサーチップ上で、DNAと接触させるとよい。あるいは、DNAをセンサーチップ上に固定した後に、このセンサーチップ上で、本発明のTRF2DNA結合ドメイン変異体タンパク質又は該変異体タンパク質を含むタンパク質と接触させてもよい。2分子間の結合、解離に伴うセンサーチップ表面での微量な質量変化をSPR (Surface Plasmon Resonance) シグナルとして検出し、このシグナルの経時変化をSensorgramと呼ぶグラフとして表示させ、これを解析ソフトで解析することにより、 K_D 値を求めることができる。 K_D 値が、 10^{-4} 以下、好ましくは 10^{-5} 以下、より好ましくは 10^{-6} 以下であれば、タンパク質とDNAが特異的な結合をしている、すなわち、複合体を形成していると言える。

10. スクリーニング方法

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合に

は、被験物質がテロメアDNAとTRF2との結合を制御することができると判定することを含む、テロメアDNAとTRF2との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法を提供する。本発明の方法において、5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAの存在下で、配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析してもよい。5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせんDNAとしては、以下の配列を有するDNAを例示することができる。

tr13: 5' -GTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号17) / 5' -CCCTAACCCCTAAC - 3' (配列番号18)

配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10位のリシン、34位のアラニン、47位のアラニン及び59位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析するには、X線結晶構造解析、核磁気共鳴(NMR)、中性子回折などの立体構造解析、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などの複合体の形状を観察する方法やm配列番号2のアミノ酸配列を有するTRF2 DNA結合ドメインの立体構造に対する任意の構造の被験物質との安定な結合様式をコンピュータでシミュレートするドッキングスタディなどの手法、本発明者らがこの明細書において開示するヒトTRF2の立体構造との類似性に基づく判断を用いることができる。

テロメアDNAとTRF2の結合を制御することができる物質は、細胞の老化を進めたりあるいは逆に遅らせたりする活性、細胞のがん化を遅らせる活性、がん細胞の細胞死を進めるような生理活性を持ちうる。従って、本発明のスクリーニング方法により、テロメアDNAとTRF2との結合を制御することができる

できると判定された物質は、抗がん剤、細胞老化抑制剤、細胞老化促進剤等に利用することができる。

〔実施例〕

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

『結果及び考察』

構造計算

hTRF2 の DNA 結合ドメインを含む領域 (hTRF2DBD : N 末端に Met が付加した Glu438 から Asn500) と DNA との複合体の構造を NMR を用いて決定した。目的タンパク質 hTRF2DBD は大腸菌大量発現系により 15N または 15N/13C ラベルしたサンプルを作成した。また、複合体に用いた DNA は以前報告されている hTRF1 と DNA との複合体の構造決定に用いられた配列 tr13 : 5' -GTTAGGGTTAGGG-3' を用いた。フリーと複合体の構造ではそれぞれ 910 と 1412 の NOEs を強度により 4 つの範囲 (1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0、2.3-6.0) にそれぞれ分けた。角度制限は ${}^3\text{JHN}\alpha < 5.5\text{Hz}$ に対して $-90^\circ < \phi < -40^\circ$ 、 ${}^3\text{JHN}\alpha > 8.5\text{Hz}$ に対して $-160^\circ < \phi < -80^\circ$ にした。フリーの構造は距離制限が 0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たし、構造的に矛盾のない構造からもっともエネルギーの低い 25 個の構造を選んだ。また、複合体の計算では DNA の制限として Watson-Crick の塩基間の水素結合の制限が GC 塩基間で $r_{G(N1)-C(N3)} = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、 $r_{G(N2)-C(O2)} = 2.86 \pm 0.2$ オングストローム、 $r_{G(O6)-C(N4)} = 2.91 \pm 0.2$ オングストローム及び TA 塩基間で $r_{A(N6)-T(O4)} = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、 and

$r_{A(N1)-T(N3)} = 2.82 \pm 0.2$ オングストロームにし、角度制限として A 型及び B 型の DNA を満たす範囲で $\alpha = -65 \pm 50^\circ$, $\beta = 180 \pm 50^\circ$, $\gamma = 60 \pm 50^\circ$, $\varepsilon = 180 \pm 50^\circ$, $\zeta = -85 \pm 50^\circ$ にした。以上の条件を用いて CNS (crystallography and NMR system; Yale University) で構造計算を行なった。複合体の計算では最初に hTRF2DBD だけの NOE を用いて計算を行い、条件を満たす 200 個の構造を決定した。次に 200 個の構造に対し、典型的な B 型 DNA をタンパクから 50 オングストロームの距離に異なった方向に置き、全ての制限を用いて計算を行った。最後に距離制限が 0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たし、構造的に矛盾のない構造を 20 個選んだ。

hTRF2 の DNA 結合ドメインの構造

決定された hTRF2 の DNA 結合ドメインを含む N 末端に Met が付加した Glu438 から Asn500 まで (hTRF2DBD) の 25 個の構造を Fig2(a) に示した。hTRF2DBD の平均座標に対する個々の rmsd は backbone で 0.34 ± 0.05 オングストローム、All heavy atoms で 0.82 ± 0.06 オングストローム、だった。hTRF1 の構造とはヘリックス間のループに若干の違いが見られるだけで基本構造はほとんど同じであり、Trp450、Val458、Leu462、Trp470、Leu474、Phe479、Ile487、Trp491、Met494 が主な分子内に疎水性のコアをつくりタンパク質の構造を安定化していた。また、疎水性のコアのほかに Glu453 と Arg482、Ser454 と Arg490 が架橋をつくり構造の安定化に寄与している。この構造は今まで知られている典型的な Myb 構造である。

hTRF2DBD と DNA の複合体の構造

複合体の構造解析に用いた DNA は以前報告された hTRF1 と DNA との複合体の構

造に使用された tr13 : 5' - GTTAGGGTTAGGG - 3' / 5' - CCCATTCCCCATTC - 3' を使用した。まず、hTRF1 同様 tr13 に hTRF2 が結合できるか確認するため NMR による滴定実験を行なった。DNA に対してタンパクを加えていったところ hTRF1 同様 1:1 で hTRF2DBD が結合することがわかった。そこで DNA とタンパクの比を 1:1 になるように試料を調整し NMR により、20 個の複合体の構造を決定した (Fig2 (b))。hTRF2DBD と tr13 の複合体の構造は平均座標に対する個々の構造の rmsd は backbone で 0.51 ± 0.11 オングストローム、All heavy atoms で 0.68 ± 0.09 であった。複合体内のタンパクの構造はフリーの構造に対して構造変化はなく、また DNA も bending などの変化はなかった。

複合体における DNA の認識

複合体における hTRF2DBD の DNA の認識の模式図は Fig3 (a) に示した。hTRF2DBD は DNA に主溝に対し三番目のヘリックスが深くはまり、Asp489 が C7'、C8' を Lys488 が A4 または G5 を認識している。また、Ala484、Val485 と T3 のメチル基が疎水的な相互作用をしている。また Met486 と Val485 のメチル基が Arg489 のメチレン基と C7'、C8' の塩基と C7' の糖鎖で疎水性の相互作用がある。その他に Thr493 のメチル基が A5' の糖鎖と疎水的な相互作用も確認できた。副溝においては Lys447 が T9 または A6' を認識している。また、塩基への直接的な認識の他に Trp450、Trp470、Ala471、Lys488、Arg490、Arg492 が DNA のリン酸骨格を認識することで DNA との相互作用を可能にしている。このような DNA への認識機構は今まで報告されているホメオドメインや hTRF1 との複合体などで見られる。特に hTRF1 とは同様の DNA 配列を認識し、また DNA 結合ドメインの構造もほとんどかわらず、その結合様式が同じであることが確認できた (Fig3 (b))。

hTRF1 と hTRF2 の DNA への認識の違い。

hTRF1 (Arg378 – Leu430) と hTRF2 (Thr445 – Leu497) の DNA 結合ドメイン領域での相同性は identity で約 59%, similarity で約 70% で大変に高い。また、決定された hTRF1 及び hTRF2 の DNA への複合体から、DNA への認識に関与しているアミノ酸はわずか 4 残基であり、hTRF2において Lys447、Ala471、Ala484、Arg496 である。しかし、この 4 残基の違いによって、DNA への主な認識様式の変化はなく、この 4 残基以外のアミノ酸の DNA への認識は hTRF1 と全く同じであった。この 4 残基は hTRF1 ではそれぞれ Arg380、Ser404、Ser417、Lys429 である。hTRF2 では Lys447 は DNA の副溝に入り T9 を認識している。hTRF1 の Arg380 も同様に T9 を認識しているが、他に A6' も同時に認識している。また、hTRF2 の Ala471 の主鎖の NH は T3 のリン酸を認識している。また Ala484 の側鎖のメチル基は T3 のメチル基と疎水性の相互作用をしている。hTRF1 ではこの 2 つの残基は Ser に変わっており、Ala471 に相当する Ser404 の主鎖の認識は同じであるが、側鎖もリン酸基への認識をしており、Ser417 でも Ala484 同様に疎水性の相互作用のほかにリン酸基への認識が確認できた (Fig. 5)。また、Arg496 は hTRF2 では DNA への相互作用に関与しておらず、hTRF1 の Lys429 は T4' のリン酸基を認識しているが、認識している構造は半分にも満たないことから DNA の認識ほとんど寄与していないのではないかと考えられる。hTRF2 は hTRF1 と 4 つのアミノ酸に違いがあることで若干、水素結合の数が少ない。このことから hTRF2 は hTRF1 よりも親和性が弱いことが予想される。

DNA への affinity 解析

DNA 認識において hTRF1 と違う 4 つのアミノ酸に対して hTRF1 と同じになるよう に変異体を作成し、wild type との違いを調べた。変異体は K447R、A471S、A484S、

R496K、qm (K447R、A471S、A484S、R496K)、dm (A471S、A484S) の 6 つを作成した。まず、この変異体に対し NMR で tr13 に対する滴定実験を行なった。各変異体に対する滴定実験の DNA のイミドプロトンのスペクトルの結果と wild type との化学シフトの差を Fig6 に示した。Fig6 (a) のスペクトルには各イミノプロトンを表記した。また、大きく変化した T8, T9 にはそれぞれ円で示した。K447R では G7, T8, T9 に大きな変化が見られた。このことから、副溝に入る Lys447 を Arg に変えることで T9 以外にも A6' も認識していると考えらる。この違いが実際 DNA への親和性にどのような違いがあるか調べるために affinity 実験を表面プラズマ共鳴 (Surface plasmon resonance; SPR) を使って行なった。

まず、hTRF2WT の tr13 (5' -GTTAGGGTTAGGG-3') への解離定数 (KD) は 10mM HEPES-KOH pH6.8, 3mMEDTA, 180mMKCl, 0.003% (v/v) X-100 の条件では $KD = (7.48 \pm 0.21) \times 10^{-7} M$ であった。次に特異的認識を使われている塩基を変えた 3 つの DNA ; T3→G3 (T3G)、G7→C7 (G7C)、T9→G9 (T9G) についても同様の実験を行なった。その結果 T3G ; $KD = (5.94 \pm 0.24) \times 10^{-6} M$ 、G7C ; $KD = (5.33 \pm 0.88) \times 10^{-5} M$ 、T9G ; $KD = (1.10 \pm 0.06) \times 10^{-4} M$ であった (表 2)。T9G の KD 値が tr13 に比べ 100 倍以上、大きいことから、特に重要な塩基であることがわかる。また同様の実験を hTRF2 の各変異体を使って同条件で行なったところ、R496K を除く変異体は WT に比べ親和性が上がった。特に 4 つの変異を入れた qm は WT に比べ約 4 倍 (qm; $KD = (1.96 \pm 0.09) \times 10^{-7} M$) も親和性が高い。また各変異体では K447R ; $KD = (2.97 \pm 0.18) \times 10^{-7} M$ 、A471S ; $KD = (4.82 \pm 0.20) \times 10^{-7} M$ 、A484S ; $KD = (5.50 \pm 0.17) \times 10^{-7} M$ 、R496K ; $KD = (7.64 \pm 0.21) \times 10^{-7} M$ であり、T9 を認識する K447R の親和性が他の変異体に比べて高いことがわかる。このことから N 末端の副溝に対する認識が DNA 結合ドメインの DNA への親和性に大きく寄与しており、hTRF2 が Lys で認識していることで hTRF1 よりも DNA への親和性が低いことがわかる。また、T3G、G7C、T9G に対しても同様な実験を行なったところ T3G は tr13 に比べ相対的に KD が約 7 倍、T9G は約 100 倍高くなっている。しかし、G7C では qm に比べ

K447R の方が KD 値が低くなるなど、T3G や T9G と各変異体との親和性の傾向が異なる。G7C では C7' が G に変わっているため、C7' を認識する Asp489 が DNA を認識できなくなっているため主溝内での特異的な認識ができなくなっている。DNA への認識が非特異的になっていると思われる。T9G への親和性は G7C に比べ 10 倍も弱いが各変異と DNA の KD 値の違いは tr13、T3G と相対的に同じ傾向を示しており、主溝と認識ヘリックスとの結合様式は変わらず、単純に親和性だけが極めて大きく落ちていると思われる。このことからも N 末端の副溝への認識が DNA への親和性に大きな影響を与えていていることが示された。

また同様の実験を hTRF1 についても同条件でおこなった。hTRF1 は tr13 への解離定数は $KD = (1.86 \pm 0.06) \times 10^{-7} M$ で、ほとんど q_m と同じ値を示した。

ホメオドメインとの比較

ホメオドメインは Myb ドメイン同様 3 本のヘリックスからなっており、第 2、第 3 ヘリックスがヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) を形成し、三番目のヘリックスが認識ヘリックスとして DNA の主溝に深く入って塩基を認識する。一般的に 1 つの DNA 結合モチーフが認識できる配列は約 4~5 塩基対であるが、c-Myb や scRap1p のように認識モチーフをもったサブドメインが複数存在し、それらが強調して DNA を認識するものや、分子間でホモダイマーやヘテロダイマーを形成して DNA を認識することで、識別できる塩基配列の長さが広がり、その結果タンパク質が DNA と相互作用できる範囲が大きくなり DNA に対する親和性が増加すると同時に塩基配列の選択性がより高くなる。しかし、ホメオドメインのいくつかは HTH モチーフのほかに N 末端や C 末端のアームも塩基の認識に関与しているため、認識範囲が約 7~10 塩基対にわたり、DNA との接触面も広く、1 つのドメインのみで DNA に結合できる。hTRF1 や hTRF2 はダイマーで DNA に結合するが、DNA 結合タンパク質間の相互作用はなく 1 つの DNA 結合ドメイン単独

で DNA に結合できる。これはホメオドメイン同様に N 末端のアームが DNA の副溝を認識することで可能になっている。DNA との複合体で構造が決定されているホメオドメインは、ほとんどの場合 Arg が副溝の TA 塩基を認識している。MAT α 1 では Lys が認識しているが、MAT α 1 と MAT α 2 は DNA とヘテロダイマーを形成し、DNA の同じ側から隣り合った主溝に、認識ヘリックスが同じ方向を向くように結合することから、1 つの DNA 結合モチーフ単独での結合ではない。Lys に比べ Arg が副溝の AT に富んだ配列に対して認識すると、その近辺の塩基やリン酸基も同時に認識できるので高い親和性で DNA を認識できる。また、複合体での構造解析がなされていないホメオドメインでも 5 番目の Arg はよく保存されていることから、副溝への認識に Arg が使われるのが Lys よりも優位だと考えられる。NMR や SPR の結果から hTRF2 は副溝を Lys で認識するために hTRF1 よりも DNA に対して親和性が弱いことがわかる。それに加えて Ala471 や Ala484 での相互作用は hTRF1 に比べて水素結合の数も少ないので、hTRF1 よりも DNA に対して解離しやすくなっている。

Biological Implication

hTRF1 と hTRF2 は C 末端に Myb ドメインが存在し、ホモ 2 量体で DNA に結合する。しかし、Myb ドメイン同士が協同的に結合するのではなく、1 つの Myb ドメイン単独で結合する。その hTRF1 と hTRF2 の Myb ドメインの相同性は非常に高く、今回の構造解析の結果 hTRF1 と hTRF2 の DNA への認識はほとんど変わらないことがわかった。しかし、ホモ 2 量体の hTRF1 の 2 つの Myb ドメインは近隣のテロメア配列に結合するだけではなく、離れたテロメア配列に結合し DNA を曲げることが *in vitro* で報告されている。hTRF2 にはそのような結合様式はない。hTRF2 は 3' 突出末端の 1 番最初に TTAGGG の配列が 1 つでもあれば 2 本鎖と 1 本鎖の結合部位にある 2 本鎖側に結合しやすくなることが報告されてい

る。また、t-loop 構造内では D-loop に TRF2 は結合することも報告されている。hTRF2 の Myb ドメインは今回の解析の結果、hTRF1 同様に 3' 突出末端の近傍以外の大部分を占める 2 本鎖のテロメア配列に結合できるはずである。しかし、hTRF2 の結合部位が 3' 突出末端に偏っていることから、1 度、hTRF1 同様に 2 本鎖テロメア配列に結合した hTRF2 は hRap1 や Mre11 complex などの hTRF2 に相互作用する他のタンパク質や、または 1 本鎖 DNA の影響で、3' 突出末端近傍に集められ、その後 t-loop の形成など機能するのではないかと考えられる。そのためには hTRF1 のように強い親和性で DNA に結合するのではなく、弱い親和性で DNA に結合したほうが、テロメア配列間を動くのに有利に働くのではないかと思える。

『実験手順』

タンパク質及びDNAの調製

TRF2全長のDNAをコードするプラスミドに対し40塩基からなるTRF2-DBDをコードするDNAのプライマーを5' 側、3' 側を用意し、PCR方によりTRF2-DBD部位をコードするDNAを増幅した。増幅したDNAをNdeI、EcoRIで制限酵素処理し、pET23bベクターに対しライゲーションし、得られたベクターを大腸菌BL21 (DE3) にトランスフォームした。

また、上記の2種類のプライマーのほかに変異体部位のアミノ酸をコードしたプライマーを5' 側、3' 側を用意した。変異体部位に対し5' 側と3' 側の2つを別々にPCR方で増幅した。得られた2本のDNAとTRF2-DBD部位の5' 側と3' 側のプライマーを混ぜPCRで増幅することで変異体をコードしたTRF2-DBD(変異体)のDNAが得られる。得られたDNAに対しTRF2-DBD同様に制限酵素、ライゲーション処理を行なって発現ベクターを得た。得られたベクターはBL21 (DE3) にトランスフォームした。

変異体作成に使用したプライマーの配列を以下に示す。上段が5'側、下段が3'側である。K447Rは5'側のみ、R496Kは3'側のみである。

TRF2DBD

5' -ggtctcgcatatggaagacagtacaaccaatataac-3' (配列番号 2 2)

5' -gcggaaattctcagttcatgccaaagtctttc-3' (配列番号 2 3)

TRF2DBD (A471S)

5' -ggaaactggtctgccatttctaaaaat-3' (配列番号 2 4)

5' -agaaatggcagaccagttccctcccc-3' (配列番号 2 5)

TRF2DBD (A483S)

5' -aaccgaacatctgtgatgattaaggat-3' (配列番号 2 6)

5' -aatcatcacagatgtcggttaacaaa-3' (配列番号 2 7)

TRF2DBD (K447R)

5' -ggtctcgcatatggaagacagtacaaccaatataacaaaaaggcagaagtgg-3' (配列番号 2 8)

TRF2DBD (R496K)

5' -ggaattctcagttcatgccaaagttttcatggtccg-5' (配列番号 2 9)

TRF2のDNA結合ドメイン(hTRF2-DBD:N末端にMetが付加したGlu438からAsn500までのアミノ酸配列)及び各変異体を大腸菌BL21(DE3)株(Novagen)においてpET23bベクターを用いて過剰発現させた。細胞を37°Cで培養した。OD₆₀₀が0.5～0.6に達したとき、1mMのイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を添加して、25°Cでタンパク質発現を誘導した。さらに3時間培養した後、細

胞を回収し、バッファー（50mMリン酸カリウムバッファー（pH7.0）、5mM EDTA、100mM NaCl）中に再懸濁した。同位体標識のため、¹⁵NH₄Cl（0.15%）及び／又は[¹³C]-グルコース（0.2%）を含有するM9最小培地を用いた。TRF2-DBDを以下の精製手順で精製した。細胞を氷上で超音波処理にて溶解した後、遠心（39,000g）した。上清をバッファー（50mMリン酸カリウムバッファー（pH7.0）、5mM EDTA、100mM NaCl）で平衡化したリン酸セルロース（p11, Whatman）カラムにロードし、150mM、200mM及び250mM NaClで段階的に溶出した。目的のタンパク質を含有する画分を回収し、3kDaカットオフ膜を有する centriprep（Amicon）又は Vivaspin（VIVASCIENCE）を用いて濃縮し、体積を2mL以下にした。このサンプルをバッファー（50mMリン酸カリウムバッファー（pH7.0）、5mM EDTA、300mM KC1）で平衡化したゲル濾過カラム（Superdex 30； Pharmacia）にアプライした。サンプルの同定と純度はMALDI-TOF質量分析法及び電気泳動により行った。

本実施例で用いるオリゴヌクレオチドフラグメント（5'-GTTAGGGTTAGGG-3'）（配列番号17.）はBex Co. Ltd（日本）から購入した。二重らせんの各鎖はバッファー（50mMリン酸カリウム（pH7.0）、1mM EDTA、150mM KC1）中で当モル比で混合し、95°Cから室温までゆっくりと冷却することによりアニールした。このサンプルをバッファー（50mMリン酸カリウムバッファー（pH7.0）、5mM EDTA、300mM KC1）で平衡化したゲル濾過カラム（Superdex 30； Pharmacia）にアプライした。

凝集を避けるために、タンパク質とDNAの両方を50mMリン酸カリウム（pH7.0）、150mMKC1に溶解し、当モル比になるまで、タンパク質を徐々にDNA溶液に添加することにより複合体を形成した。サンプルを10%D₂O（v/v）中で5mMリン酸カリウム（pH6.9）で透析した。

NMR分析法

10%（v/v）又は100%D₂Oを含有する5mMリン酸カリウムバッファー（pH6.9）中

の 1.0-1.5mM の TRF2-DBD-DNA 複合体を NMR 実験に用いた。NMR 実験は 303K で Bruker DMX-600 及び-800 上で行った。タンパク質の主鎖のアサイメントは 3D HN(CO)CA, 3D HNCA, 3D HNCO (Grzesiek, S. & Bax, A. Improved three-dimensional triple resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* 96, 432-440. (1992a))、3DHN (CA) CO, 3D CBCANH 及び 3D CBCA (CO) NH (Grzesiek S and Bax A (1992b) Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6291-6293.) から得た。タンパク質側鎖のアサイメントは、3D HBHA (CO) NH (1992b), 3D HCCH-TOCSY (Kay LE, Xu G-Y, Singer AU, Muhandiram DR and Forman-Kay JD (1993) A gradient-enhanced HCCH-TOCSY experiment for recording side-chain ¹H and ¹³C correlations in H₂O sample of protein. *J. Magn. Reson. B.*, 101, 333-337.), 3D HCCH-COSY, 3D ¹⁵N-edited NOESY, 及び 3D ¹⁵N-edite TOCSY 実験から得た。主鎖の二面角 Φ 制限に対する ³JHN α 結合定数は 3D HNHA (Vuister GW and Bax A (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three bond J- (HN-H α) coupling constants in ¹⁵N-enriched protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 7772-7777.) 実験により測定した。

DNA 共鳴のアサイメント及び分子内距離制限は 2D NOESY, 2D TOCSY, 及び ¹³C 又は ¹³C/¹⁵N filtered pulse scheme 付き 2D DQF-COSY (Ogura K, Terasawa H and Inagaki F (1996) An improved double-tuned and isotope-filtered pulse scheme based on a pulse field gradient and a wide-band inversion shaped pulse. *J. Biomol. NMR*, 8, 492-498.) から得た。分子間距離制限は、3D ¹³C-edited (F1), ¹³C-filtered (F3) NOESY 実験及び 3D ¹⁵N-edited (F2), ¹⁵N/¹³C-filtered (F3) NOESY 実験 (Ogura K, Terasawa H and Inagaki F (1996) An improved double-tuned and isotope-filtered pulse scheme based on a pulse field gradient and a wide-band inversion shaped pulse. *J. Biomol. NMR*, 8, 492-498.) から得た。

すべての NMR スペクトルを NMRPipe (Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J and Bax A (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX PIPES. *J. Biomol. NMR*, 6, 277-293.) 及び PIPP (Garret DS, Powers R, Gronenborn AM and Clore GM (1991) A common sense approach to peak picking in two-, three-, and four-dimensional spectra using automatic computer analysis of contour diagrams. *J. Magn. Reson.*, 99, 214-220.) ソフトウェアを用いて、処理及び解析した。

構造計算

TRF2-DBD のプロトン間距離制限は NOESY スペクトルのクロスピーク強度から導き出した。NOE を、それぞれ、強い、中程度、弱い、非常に弱い NOE に相当する 1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0 及び 2.3-6.0 オングストロームの 4 つの距離レンジに分類した。さらに、ねじれ角制限を $3JHN\alpha$ 結合定数から導き出した。制限角の範囲は、 $3JHN\alpha < 5.5\text{Hz}$ に対して $-90^\circ < \phi < -40^\circ$ 、 $3JHN\alpha > 8.5\text{Hz}$ に対して $-160^\circ < \phi < -80^\circ$ にした。分子内 DNA の NOE を、それぞれ、強い、中程度、弱い、非常に弱い NOE に相当する 1.8-3.0、2.3-4.0、2.3-5.0 及び 2.3-6.0 オングストロームの 4 つの距離レンジに分類した。偽原子補正を上限に対して適用した。DNA 内の水素結合制限を用いて、塩基対を維持した。以下の水素結合制限により、ワトソン-クリック塩基対形成を DNA 中に維持した。GC 塩基対に対しては、 $r_{G(N1)-C(N3)} = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、 $r_{G(N2)-C(O2)} = 2.86 \pm 0.2$ オングストローム、及び $r_{G(O6)-C(N4)} = 2.91 \pm 0.2$ オングストローム、TA 塩基対に対しては、 $r_{A(N6)-T(O4)} = 2.95 \pm 0.2$ オングストローム、及び $r_{A(N1)-T(N3)} = 2.82 \pm 0.2$ オングストローム (Grnbenborn, A. M. & Clore, G. M. Three-dimensional structure of proteins in by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Seq Date Anal.* 2, 1-28. (1989))。この DNA に対するゆるいねじれ角制限を用いて、A 形及び B 形 DNA の両方を満たす角度制限 ($\alpha = -65 \pm 50^\circ$ ， $\beta = 180 \pm 50^\circ$ ， γ

$\phi = 60 \pm 50^\circ$, $\psi = 180 \pm 50^\circ$, 及び $\chi = -85 \pm 50^\circ$ (Omicinski, J. G., Pedone, P. V., Felsenfeld, G., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *Nat. Struct. Biol.* 4, 122–132. (1997); Wojciak, J. M., Connolly, K. M. & Clubb, R. T. NMR structure of the Tn916 integrase-DNA complex. *Nat. Struct. Biol.* 6, 366–373. (1999)) にした。DNA に対する NOE のパターンは B 形 DNA に典型的なものであるので、DNA に対するこれらの水素結合及びねじれ角制限は正当なものと判断される (Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York. (1986).)。

最初に、crystallography and NMR System (CNS; Yale University) を用いて、タンパク質のみの 200 個の構造を計算した。次に、B 形 DNA 及び計算した 200 個の hTRF2-DBD からスタートして、全ての NOE を用いて hTRF2-DNA 複合体の構造を simulated annealing protocols 計算した。B 形 DNA は種々の配向でタンパク質から 50 オングストローム離れた位置に配置した。全部で、200 個の構造の hTRF2-DNA 複合体が計算された。これらのうち、52 個が距離制限が 0.3 オングストローム以下、角度制限が 5° 以下を満たしており、エネルギーが最も低い構造的に矛盾のない構造を 20 個選んだ。

表面プラズマ共鳴分析

affinity 分析を Biacore3000 装置を用いて行った。すべての実験は 293K で 10mM HEPES-KOH, 3mM EDTA, 180mM KCl 及び 0.003% Triton X-100 (v/v) (pH6.8) を含有するバッファーを用いて行った。SA ストレプトアビジンセンサーチップのフローセルをビオチン化された 13mer のオリゴスクレオチドでコートした。タンパク質と DNA の反応が平衡化するまで、タンパク質を 3-5 分間かけて $10 \mu \text{L}/\text{分}$ の流速でフローセルに注入した。2 M KCl で 30 秒間洗浄することにより、結合したタンパク質を除去した。平衡解離定数 (KD) を各アライド濃度でセン

サーグラムの平衡領域における RU 値のスキャッチャード分析から計算した。

BIAevaluation ver. 3. 2 を用い、この親和性データを分析した。

表1

20個のTRF2複合体の構造と25個のTRF2の構造の統計値

タンパク		
距離制限		
残基内 ($i=j=0$)	218	196
近距離 ($ i-j <5$)	573	511
長距離 ($ i-j \geq 5$)	231	203
合計	1022	910
角度制限 ϕ	38	41
核酸		
距離制限		
塩基内	131	
隣接	162	
塩基間	4	
合計	297	
タンパク-核酸	93	
合計	1450	
構造計算に対する統計値		
実験値の制限からの平均二乗誤差		
NOE(Å)	$(4.70 \pm 0.70) \times 10^{-3}$	$(2.16 \pm 0.04) \times 10^{-3}$
角度(deg.)	$(1.93 \pm 1.18) \times 10^{-2}$	$(9.83 \pm 3.46) \times 10^{-2}$
個々の制限からの平均二乗誤差		
結合長(Å)	$(1.10 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(1.26 \pm 0.03) \times 10^{-3}$
結合角(deg.)	$(2.85 \pm 0.04) \times 10^{-1}$	$(4.58 \pm 0.01) \times 10^{-1}$
面外変角 (deg.)	$(1.60 \pm 0.07) \times 10^{-1}$	$(3.35 \pm 0.03) \times 10^{-1}$
複合体:タンパク (447-496) 核酸 (1-11(3'-13'))		
タンパク単体:タンパク (450-496)		
原子座標に対する平均二乗誤差 (Å)		
タンパク	$0.43 \pm 0.09 / 0.81 \pm 0.08$	$0.34 \pm 0.05 / 0.82 \pm 0.06$
核酸	$0.43 \pm 0.14 / 0.38 \pm 0.13$	
タンパク-核酸	$0.51 \pm 0.11 / 0.68 \pm 0.09$	
PROCHECK ラマチャンドランプロット (%)		
最も好ましい領域の残基	83.5	84.5
許される領域の残基	15.5	13.9
一般的には許されてもよい領域の残基	0.9	1.6
許されない領域の残基	0.0	0.0

表2

10mM HEPES-KOH pH6.8, 3mM EDTA, 180mM KCl, 0.003%(v/v) X-100

	hTRF1	hTRF2	qm	dm	K447R	A471S	A484S	KD (M)
tr13	(1.86±0.06)×10 ⁻⁷	(7.48±0.21)×10 ⁻⁷	(1.96±0.09)×10 ⁻⁷	(3.85±0.17)×10 ⁻⁷	(2.97±0.18)×10 ⁻⁷	(4.82±0.20)×10 ⁻⁷	(5.50±0.17)×10 ⁻⁷	(7.64±0.21)×10 ⁻⁷
T3G	(7.95±0.41)×10 ⁻⁷	(5.94±0.24)×10 ⁻⁶	(9.02±0.39)×10 ⁻⁶	(2.58±0.14)×10 ⁻⁶	(2.19±0.13)×10 ⁻⁶	(3.07±0.13)×10 ⁻⁶	(4.03±0.15)×10 ⁻⁶	(4.92±0.17)×10 ⁻⁶
G7C	(1.22±0.22)×10 ⁻⁵	(5.33±0.88)×10 ⁻⁵	(4.44±0.43)×10 ⁻⁶	(3.38±0.32)×10 ⁻⁵	(2.45±0.17)×10 ⁻⁵	(3.23±0.28)×10 ⁻⁵	(5.07±0.47)×10 ⁻⁵	(8.70±1.13)×10 ⁻⁵
T9G	(3.14±0.14)×10 ⁻⁶	(1.10±0.06)×10 ⁻⁴	(2.65±0.09)×10 ⁻⁵	(4.79±0.25)×10 ⁻⁵	(3.70±0.21)×10 ⁻⁵	(4.42±0.13)×10 ⁻⁵	(6.91±0.35)×10 ⁻⁵	(1.14±0.12)×10 ⁻⁴

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、TRF2のテロメア二重らせんDNA結合能が野生型より非常に強い変異体が提供された。本発明の変異体は、TRF2が関与する事象（例えば、癌、老化、アポトーシスなど）の制御に利用することができる。例えば、本発明の変異体を利用して、老化やアポトーシスを防止できると考えられる。

また、本発明により、テロメアタンパク質TRF2-DNA結合ドメインとテロメア二重らせんDNAとの複合体構造とその機能が解析され、TRF2のDNAへの結合能を調節できる薬剤のスクリーニングが可能となった。

配列表フリーテキスト

<配列番号1>

配列番号1は、野生型hTRF2-DBDのDNA配列を示す。

<配列番号2>

配列番号2は、野生型hTRF2-DBDのアミノ酸配列を示す。

<配列番号3>

配列番号3は、変異体K447RのDNA配列を示す。

<配列番号4>

配列番号4は、変異体K447Rのアミノ酸配列を示す。

<配列番号5>

配列番号5は、変異体A471SのDNA配列を示す。

<配列番号6>

配列番号 6 は、変異体 A471S のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 7 >

配列番号 7 は、変異体 A484S の DNA 配列を示す。

<配列番号 8 >

配列番号 8 は、変異体 A484S のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 9 >

配列番号 9 は、変異体 R496K の DNA 配列を示す。

<配列番号 10 >

配列番号 10 は、変異体 R496K のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 11 >

配列番号 11 は、変異体 qm の DNA 配列を示す。

<配列番号 12 >

配列番号 12 は、変異体 qm のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 13 >

配列番号 13 は、変異体 dm の DNA 配列を示す。

<配列番号 14 >

配列番号 14 は、変異体 dm のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 15 >

配列番号 15 は、野生型 hTRF2 の DNA 配列を示す。

<配列番号 16 >

配列番号 16 は、野生型 hTRF2 のアミノ酸配列を示す。

<配列番号 17 >

配列番号 17 は、二重らせんDNAであるtr13の一方の鎖のDNA配列を示す。

<配列番号 18 >

配列番号 18 は、二重らせんDNAであるtr13の他方の鎖のDNA配列を示す。

<配列番号 19 >

配列番号 1 9 は、テロメア DNA の変異体である T3G の DNA 配列を示す。

<配列番号 2 0>

配列番号 2 0 は、テロメア DNA の変異体である G7C の DNA 配列を示す。

<配列番号 2 1>

配列番号 2 1 は、テロメア DNA の変異体である T9G の DNA 配列を示す。

<配列番号 2 2>

配列番号 2 2 は、TRF2-DBD 部位の 5' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 3>

配列番号 2 3 は、TRF2-DBD 部位の 3' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 4>

配列番号 2 4 は、TRF2-DBD 変異体 A471S 部位の 5' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 5>

配列番号 2 5 は、TRF2-DBD 変異体 A471S 部位の 3' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 6>

配列番号 2 6 は、TRF2-DBD 変異体 A483S 部位の 5' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 7>

配列番号 2 7 は、TRF2-DBD 変異体 A483S 部位の 3' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 8>

配列番号 2 8 は、TRF2-DBD 変異体 K447R 部位の 5' 側のプライマーの配列を示す。

<配列番号 2 9>

配列番号 2 9 は、TRF2-DBD 変異体 R496K 部位の 3' 側のプライマーの配列を示す。

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 又は (b) の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、10 位のアミノ酸、34 位のアミノ酸、47 位のアミノ酸及び 59 位のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん D N A への結合能が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する野生型 T R F 2 D N A 結合ドメインよりも高いタンパク質

2. (a) のタンパク質が以下の (ia) ~ (via) のいずれかのタンパク質である請求項 1 記載の T R F 2 D N A 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩。

(ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iiia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(iva) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(va) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換、47 位のアラニンからセリンへの置換

及び 59 位のアルギニンからリシンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(via) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(vii a) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、34 位のアラニンからセリンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

(vii ia) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、10 位のリシンからアルギニンへの置換、34 位のアラニンからセリンへの置換及び 47 位のアラニンからセリンへの置換がなされているアミノ酸配列を有するタンパク質

3. 請求項 1 記載のタンパク質をコードする DNA。

4. 請求項 3 記載の DNA を含有する組換えベクター。

5. 請求項 4 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

6. 請求項 3 記載の DNA で形質転換した宿主を培養し、培養物から TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を採取することを含む TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質の製造方法。

7. 請求項 1 記載の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質又はその塩に対する抗体。

8. 請求項 1 記載の TRF2 DNA 結合ドメイン変異体タンパク質を含むタンパク質又はその塩。

9. 請求項 1 又は 8 記載のタンパク質と DNA との複合体。

10. 配列番号 17 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換、7 番目の G から C への置換及び 9 番目の T から G への置換からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換がなされている塩基配列を有する DNA。

1 1. 以下の (ib) ~ (iiib) のいずれかの D N A である請求項 1 0 記載の D N A。

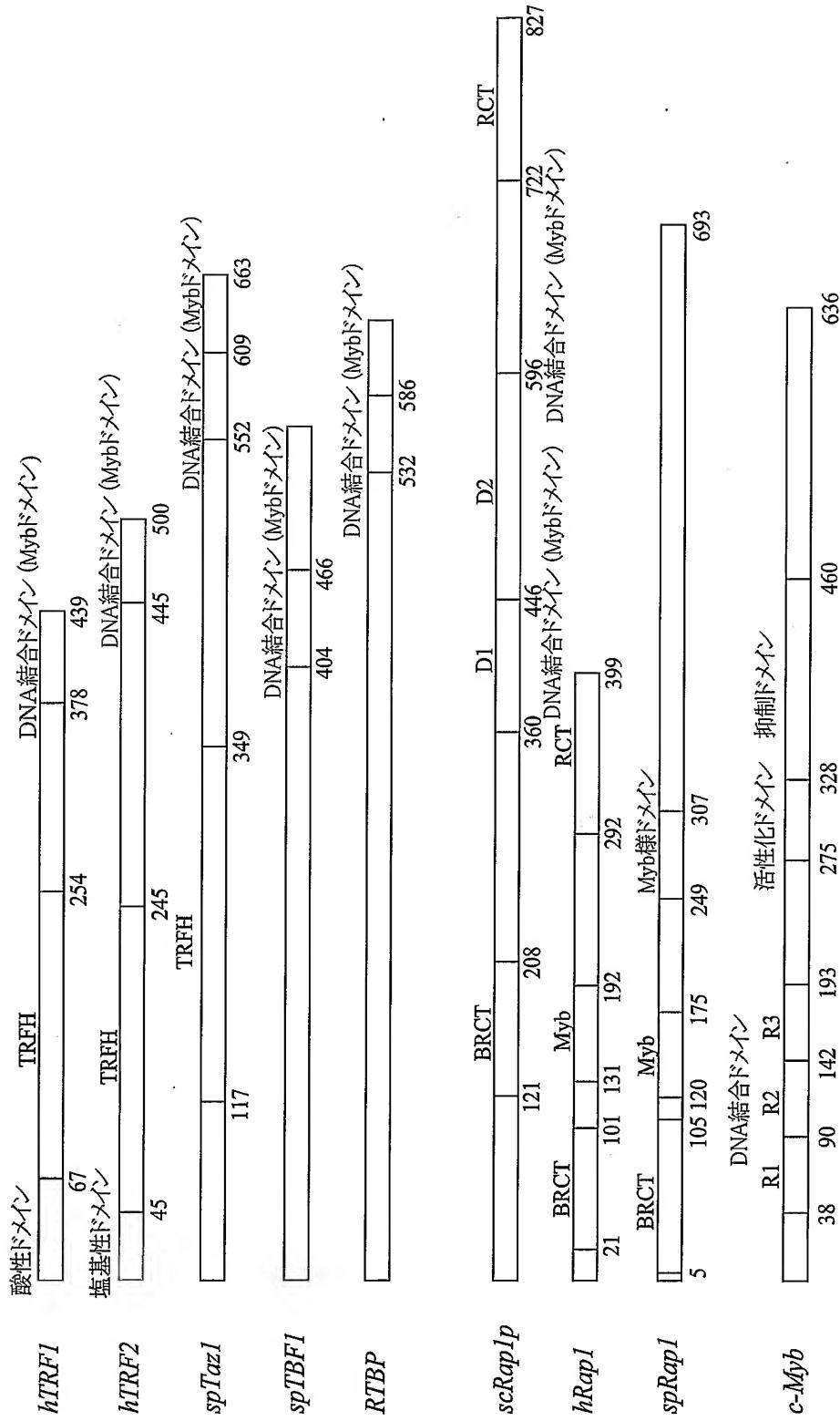
(ib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、3 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する D N A

(iib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、7 番目の G から C への置換がなされている塩基配列を有する D N A

(iiib) 配列番号 1 7 の塩基配列において、9 番目の T から G への置換がなされている塩基配列を有する D N A

1 2. 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する T R F 2 D N A 結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10 位のリシン、34 位のアラニン、47 位のアラニン及び 59 位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析し、相互作用する場合には、被験物質がテロメア D N A と T R F 2 との結合を制御することができると判定することを含む、テロメア D N A と T R F 2 との結合を制御することができる物質をスクリーニングする方法。

1 3. 5' -TTAGGG-3' で表される配列を含む二重らせん D N A の存在下で、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する T R F 2 D N A 結合ドメイン又は該ドメインを含むタンパク質が、10 位のリシン、34 位のアラニン、47 位のアラニン及び 59 位のアルギニンからなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸部位で、被験物質と相互作用するか否かを解析する請求項 1 2 記載の方法。



<i>hTRF1</i>	(378)	RKRQAWLWEEDKNLRSGVVRKYG-----EGNWSKILLHYKENNRSTSVMILKDRWRTMKKL---
<i>hTRF2</i>	(445)	TKKQKWTVEESEWVKAGVQKYG-----EGNWAISKNYPFVNRTAVMIKDRWRTMKRL---
<i>sptTazl</i>	(556)	RTRRKWTDEEENELYEMISQHG-----CCWSKIIHIQK-(8)-FGPTQIKDKARLIKAR---
<i>sptBFI</i>	(407)	KAKRTWSKEEEALVEGLKEVG-----PSWSKILDLYG-----TQVQLKDARNWKLQ---
<i>RTBP</i>	(532)	RIRRPETVAEVELLVEAVEHLG-----TGRWRDVKFRAF-(6)-TYVDLKDWKWTLVHT---
<i>sCRap1p D1</i> (360)	--KASFTDEEDEFILDVVRKNP----(5)---HTLYDEISHYVP--NHHTGNNSIRHRERYVLSK---	
<i>sCRap1p D2</i> (446)	--KRKESSADEDTIATAVKKQE----(56)---AREEFKHFAEEHA-AHTENAMWDRERKFLLAYG-	
<i>hRap1</i>	(132)	-GRIAFTDADDVAILTYVKENA----(8)---NAIWKKAMEKSILT-QHSWQSOSLKDRLKLHRLG---
<i>sPRap1</i>	(132)	-KRELETTDEKILIDHVHKND----(5)---TKVYEEELARKYP--QHSLESWRQHYKYMKKR---
<i>c-Myb RI</i>	(38)	LGKTRWTREEDEKLKKLVEONG----TDDWKVIANYL P--NRTDVQCQHRWQKVKVLNP---
<i>c-Myb R2</i>	(90)	LIKGPWTKEEDQRVIEIIVQKYG----PKRWSSVIAKHLK--GRIGKOCREWHNNHLP---
<i>c-Myb R3</i>	(142)	VKKTSWTEEEEDRIIYQAHKRLG----NRWAEIAKLLP--GRTDNAIKNEWNSTMRR---

図 1 (b)

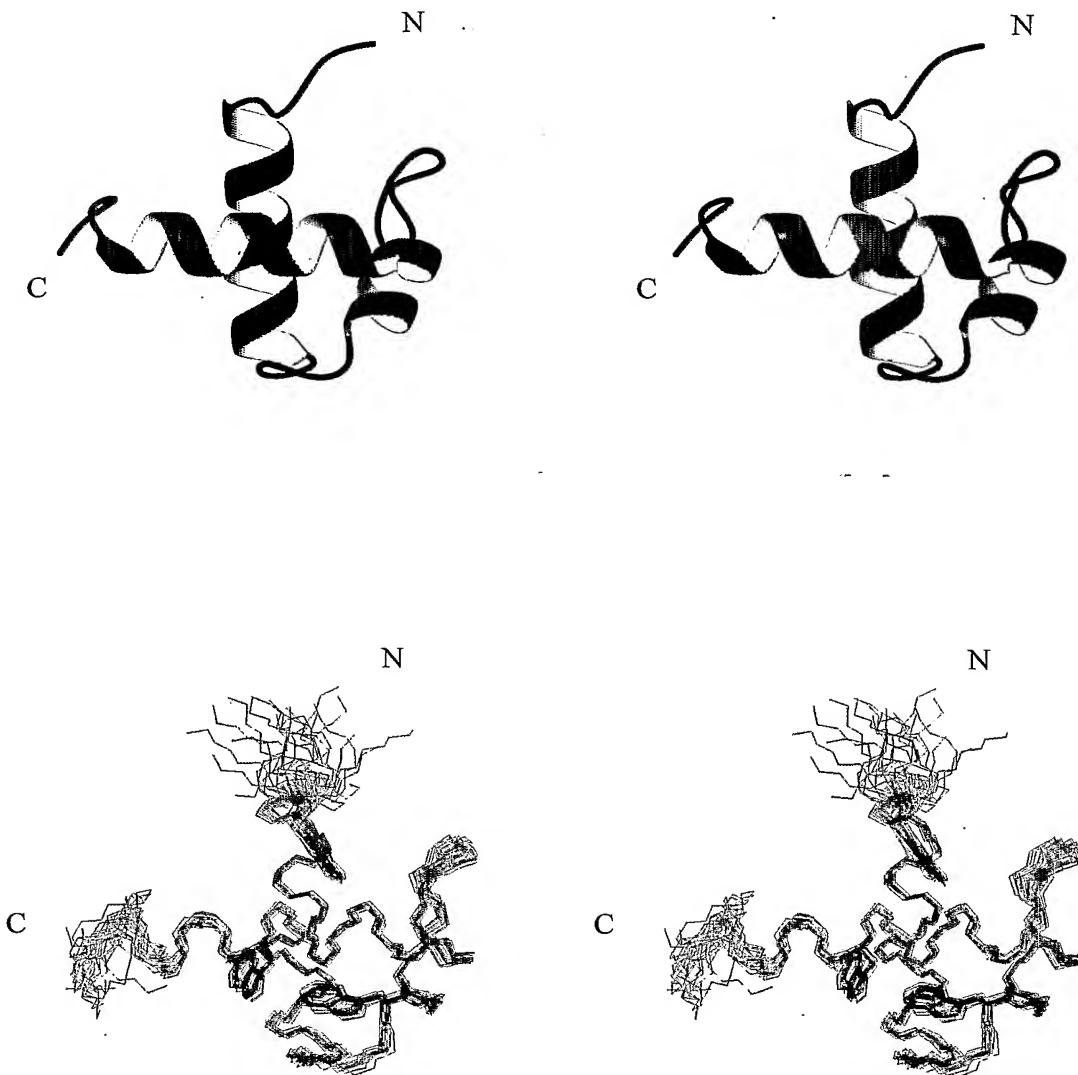
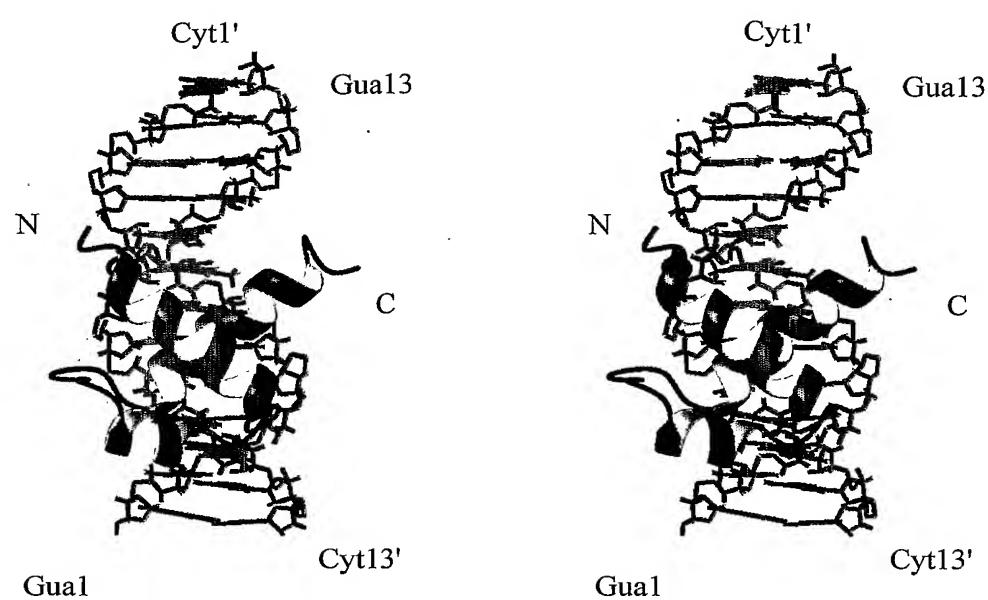


図2(a)

hTRF2とDNAとの複合体

(a)



(b)

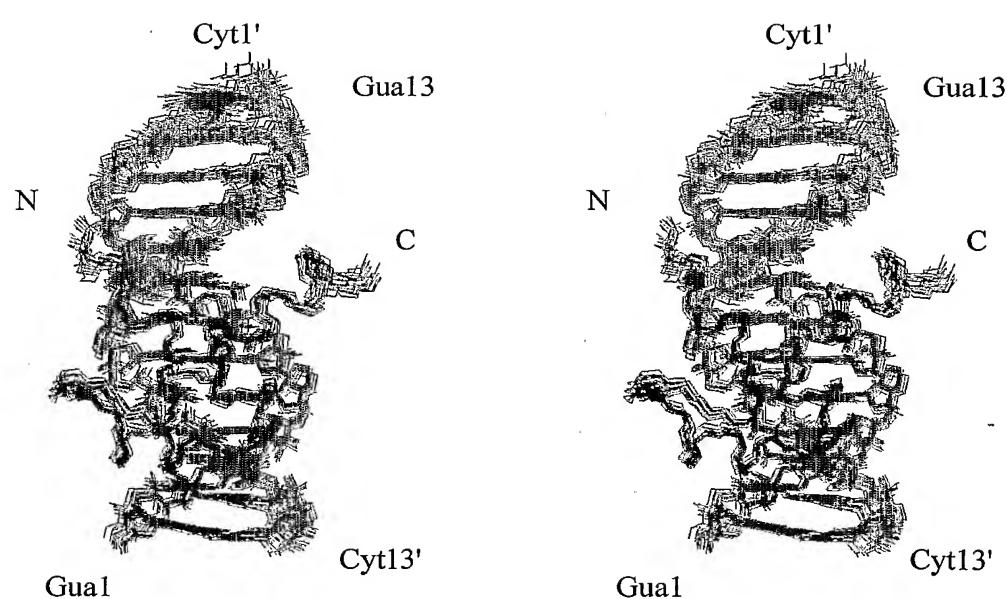


図2 (b)

hTRF1とDNAとの複合体

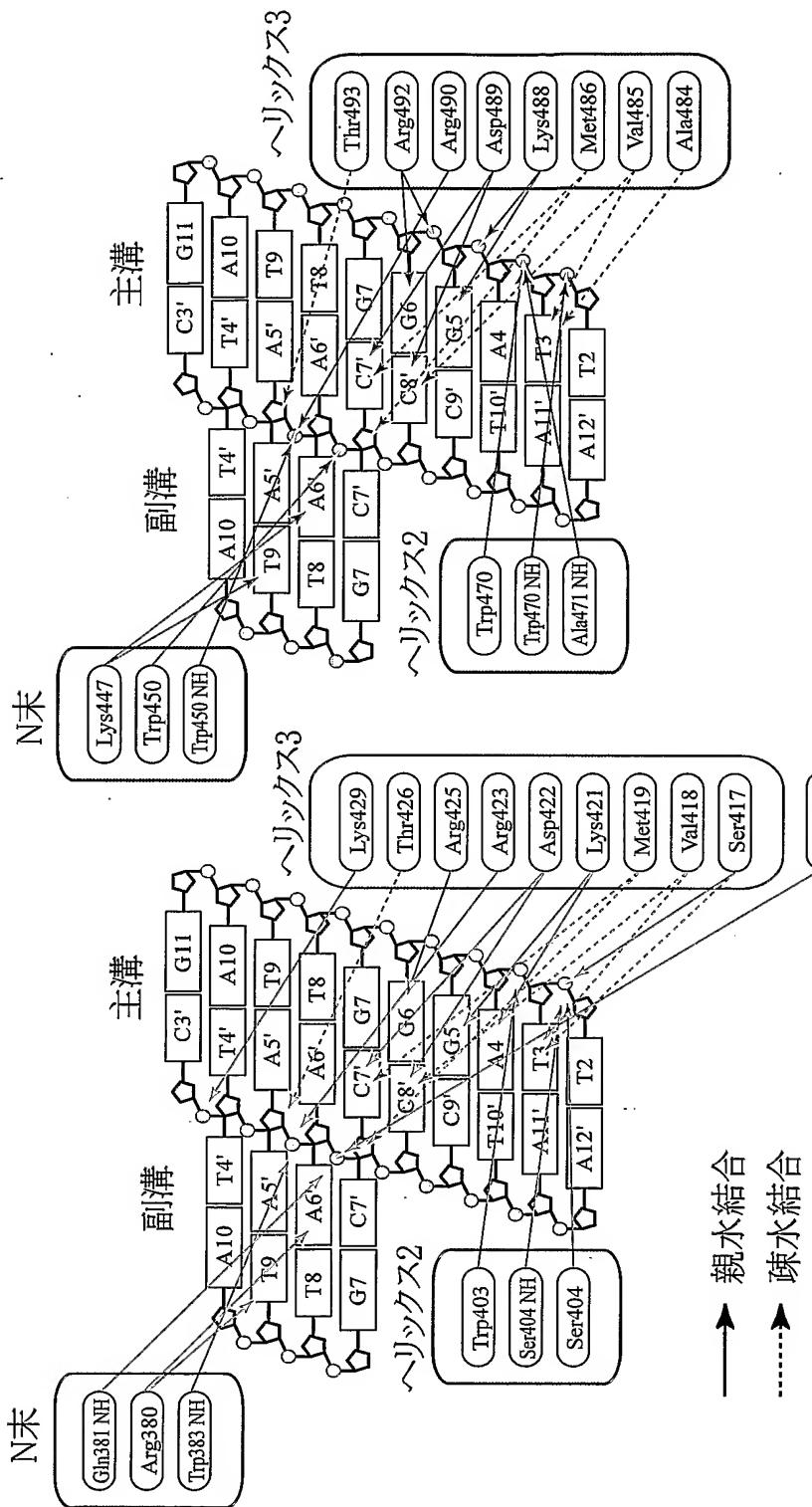
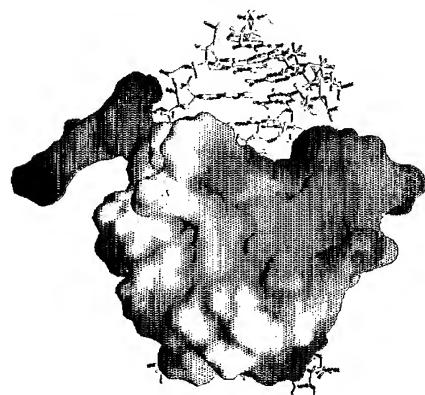


図 3 (a)

hTRF1とDNAとの複合体



hTRF2とDNAとの複合体

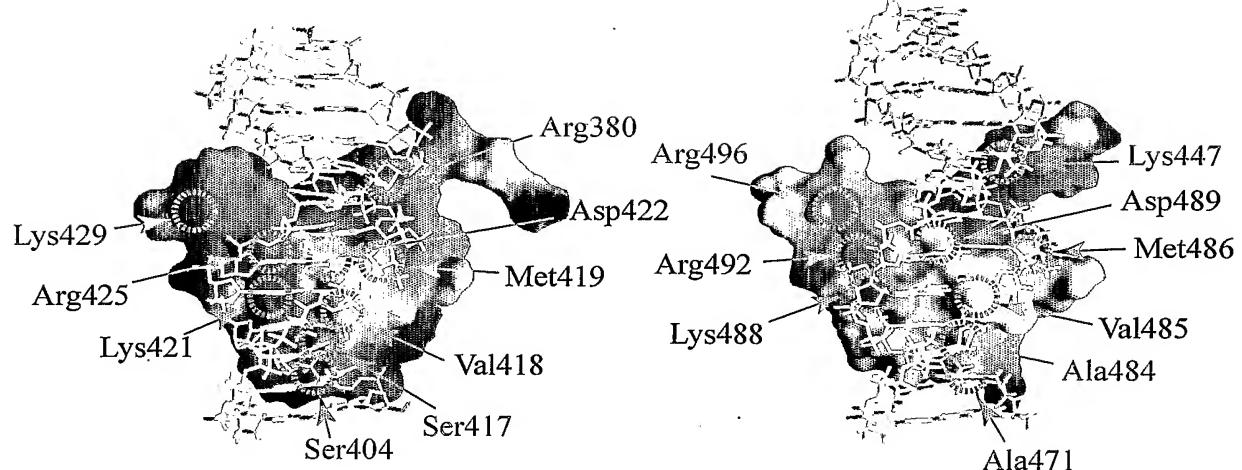
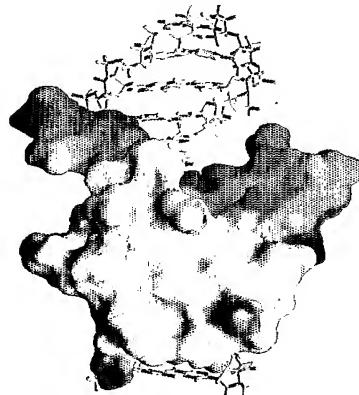


図 3 (b)

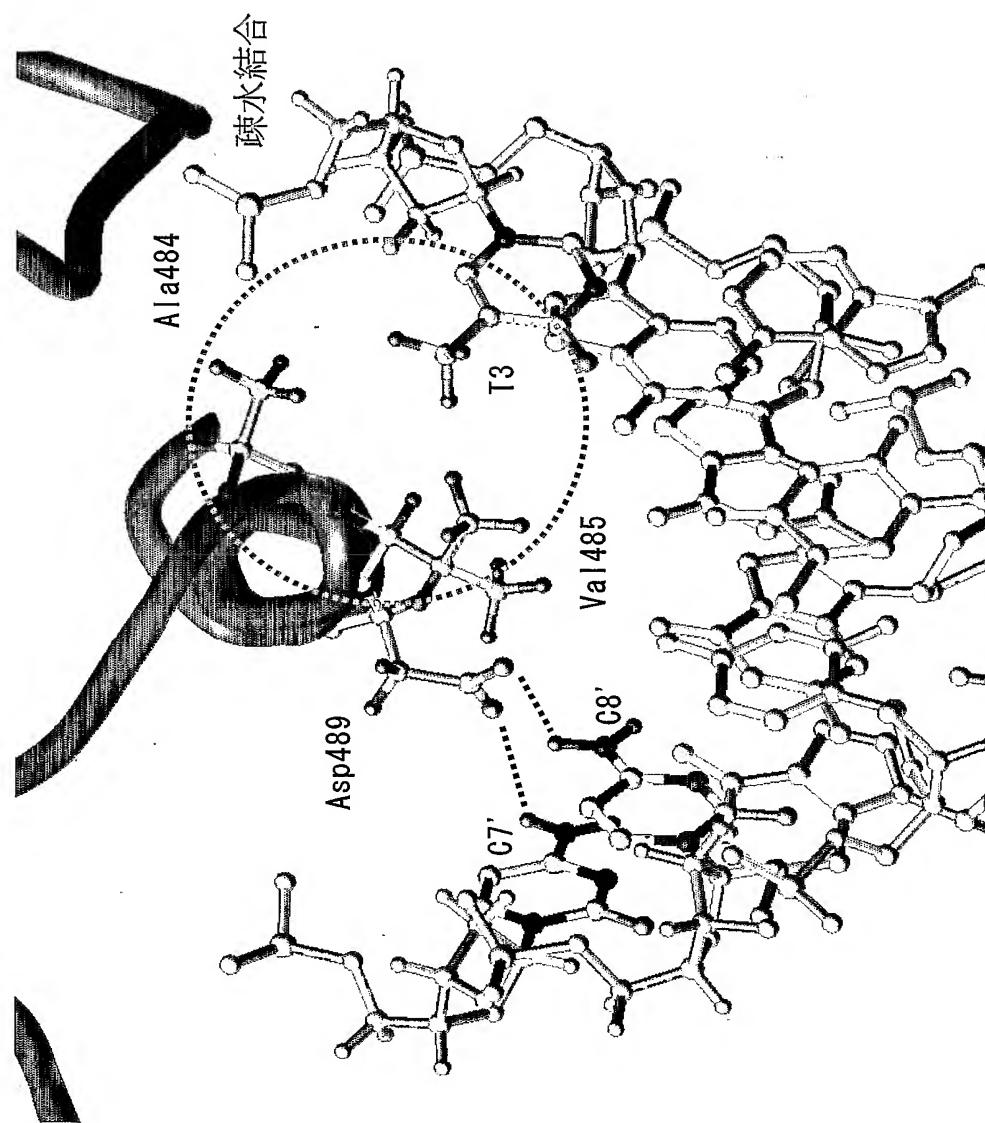
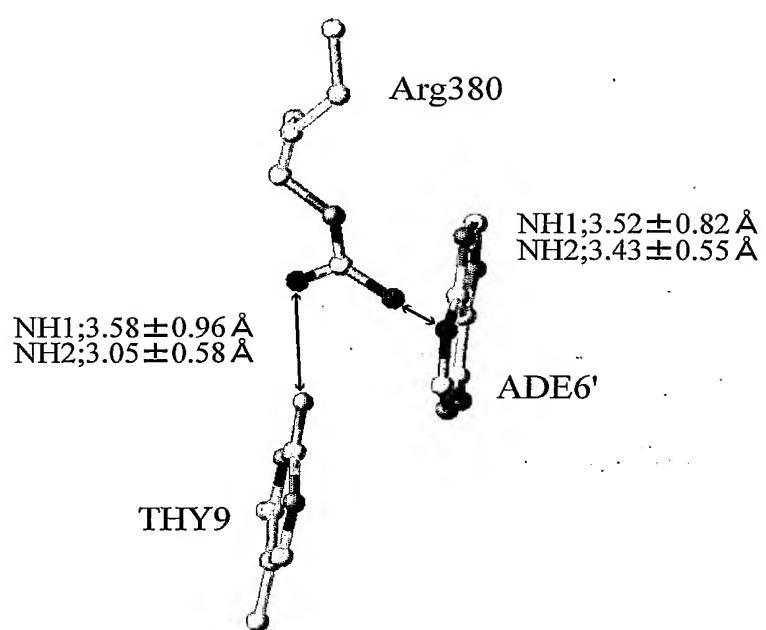


図4

hTRF1



hTRF2

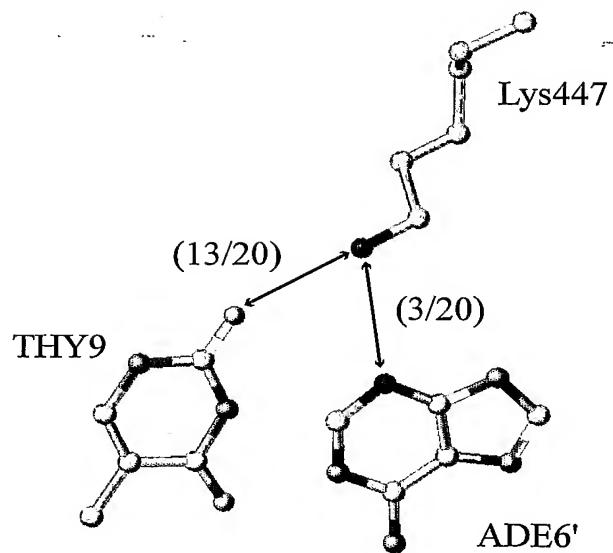
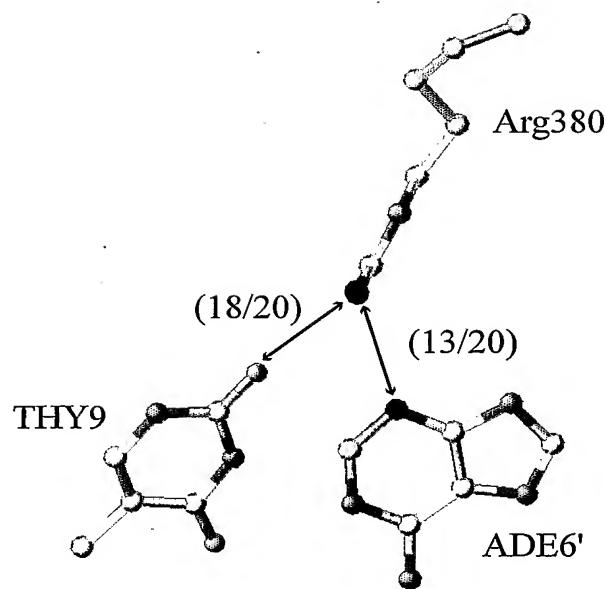
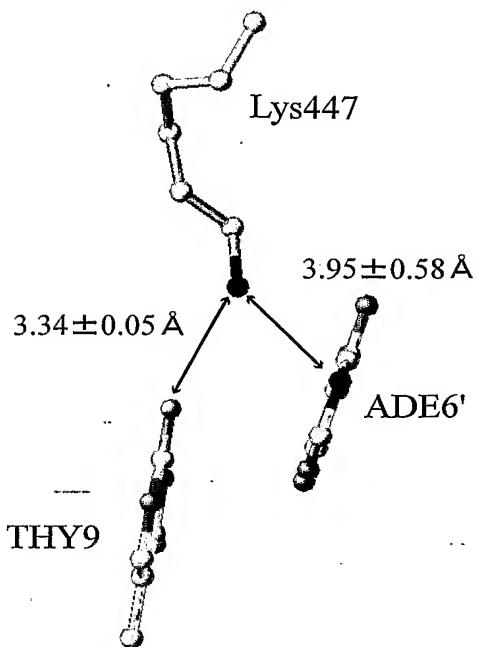


図 5 (a)

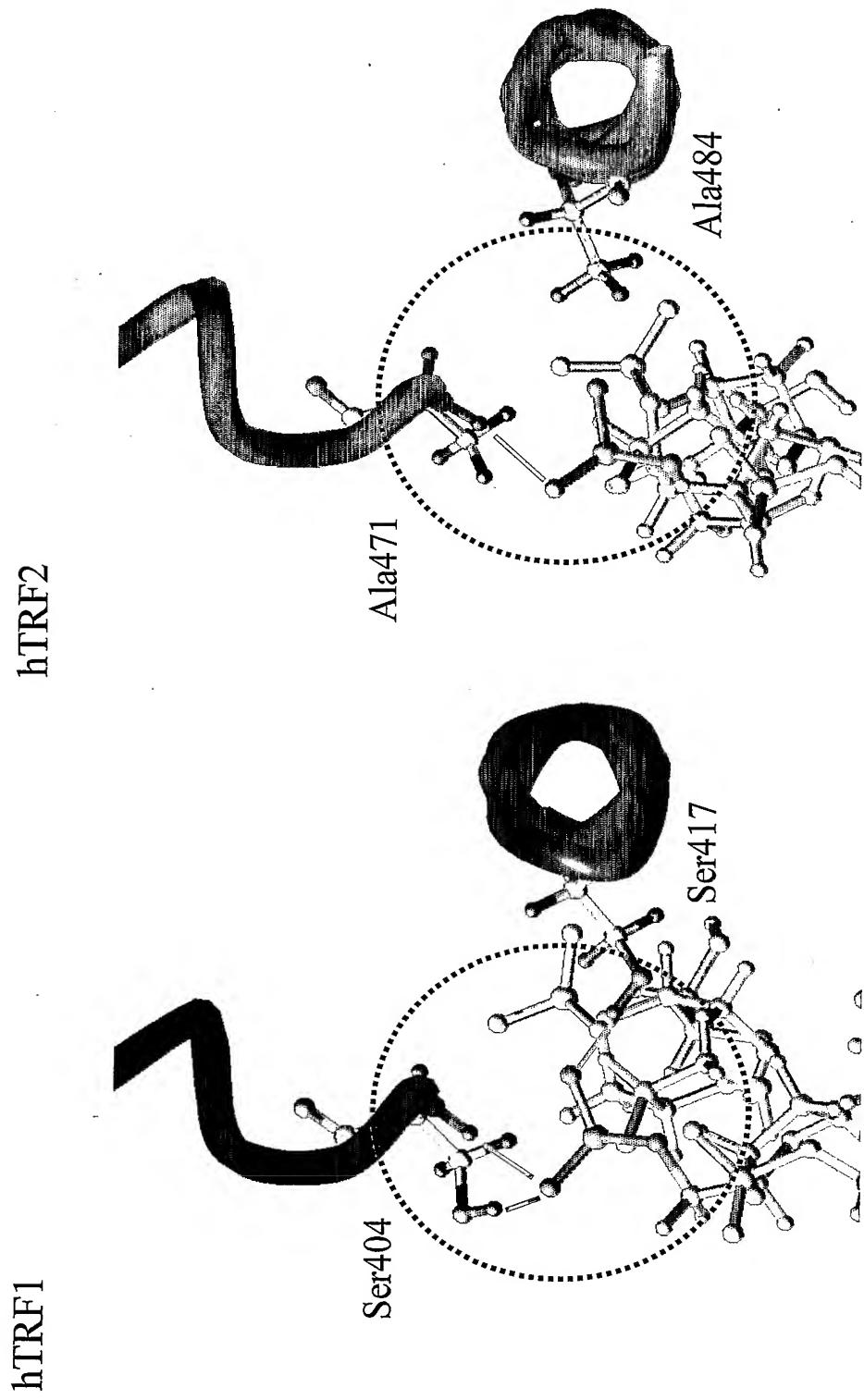


图 5 (b)

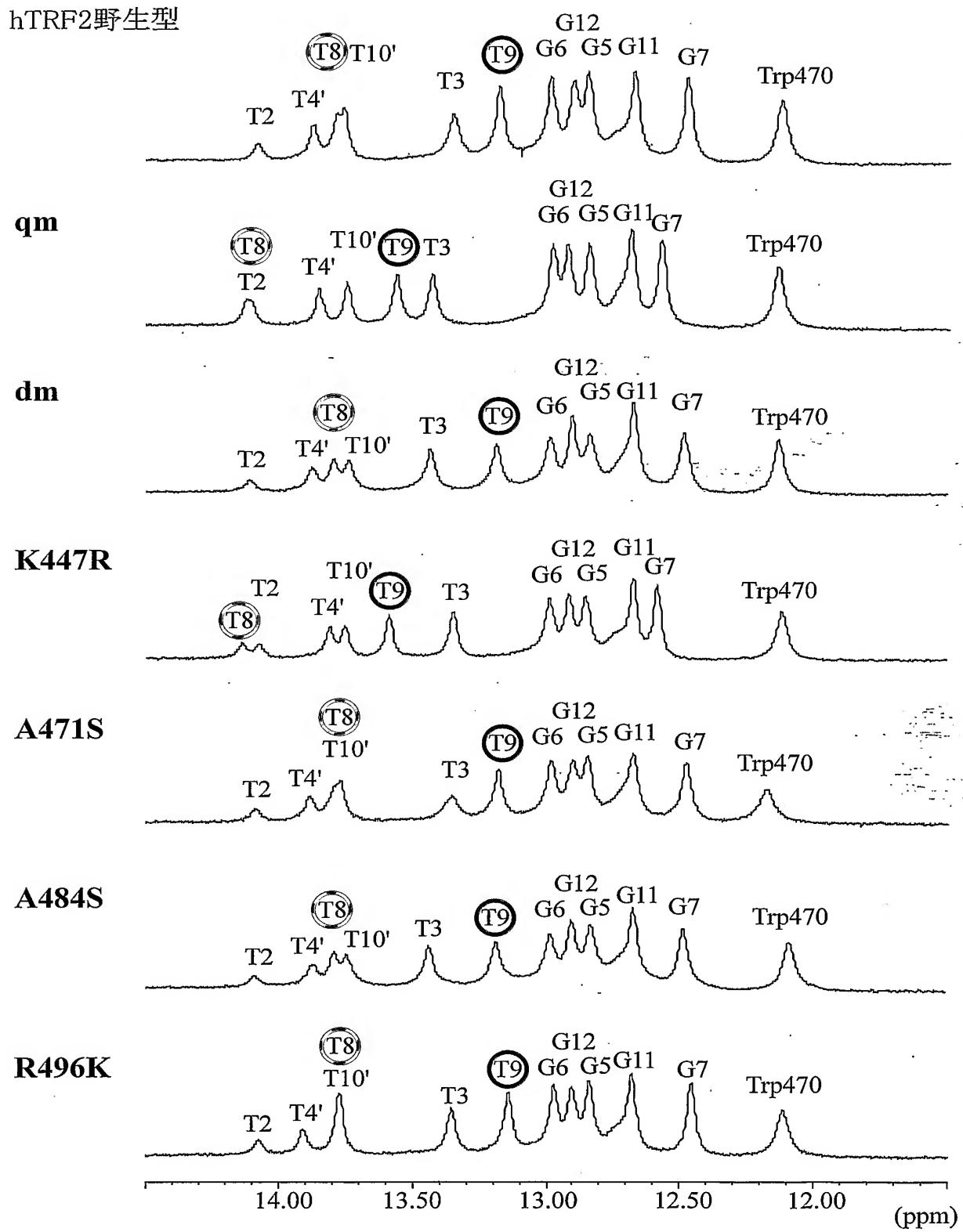


図 6 (a)

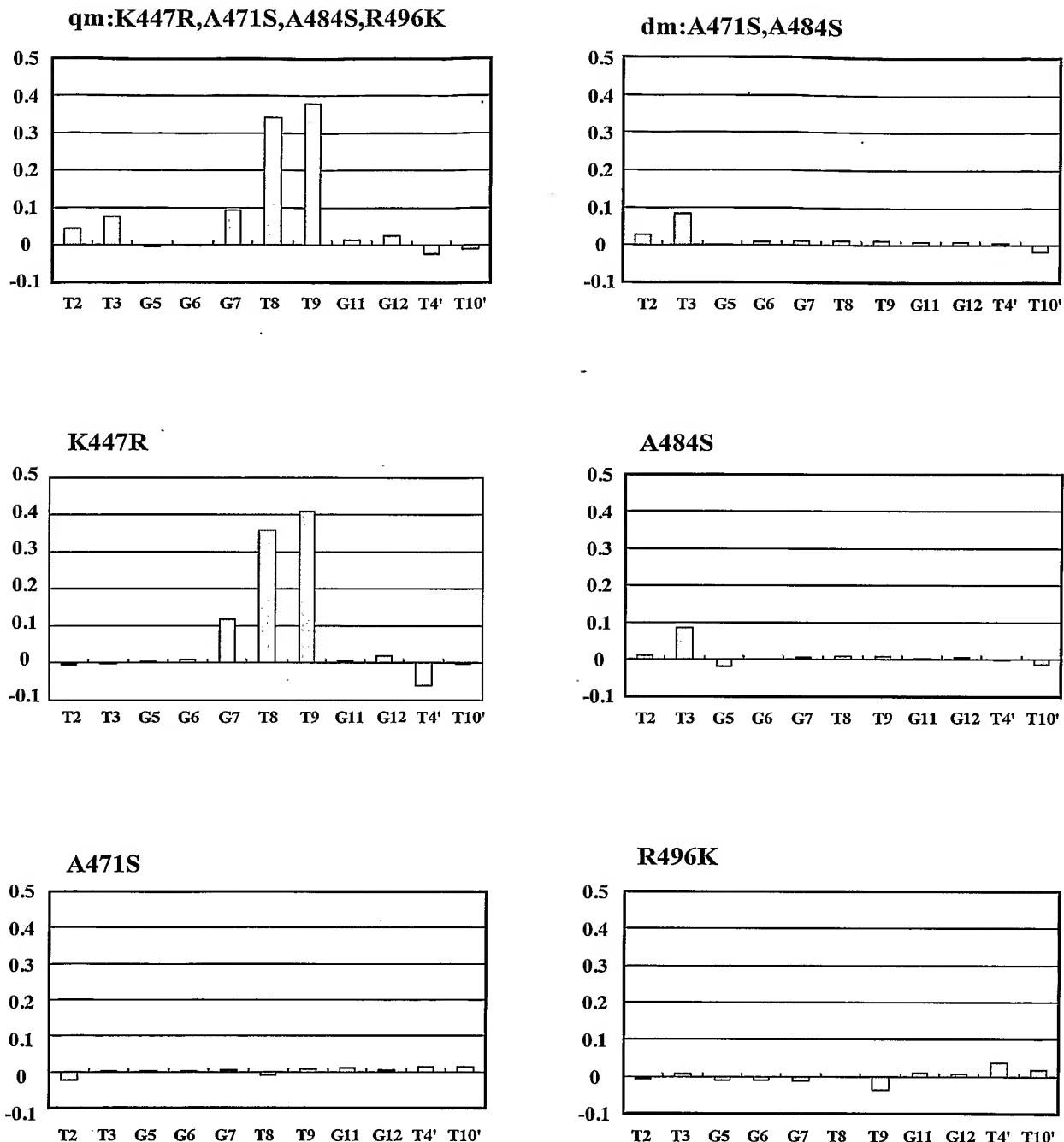


図 6 (b)

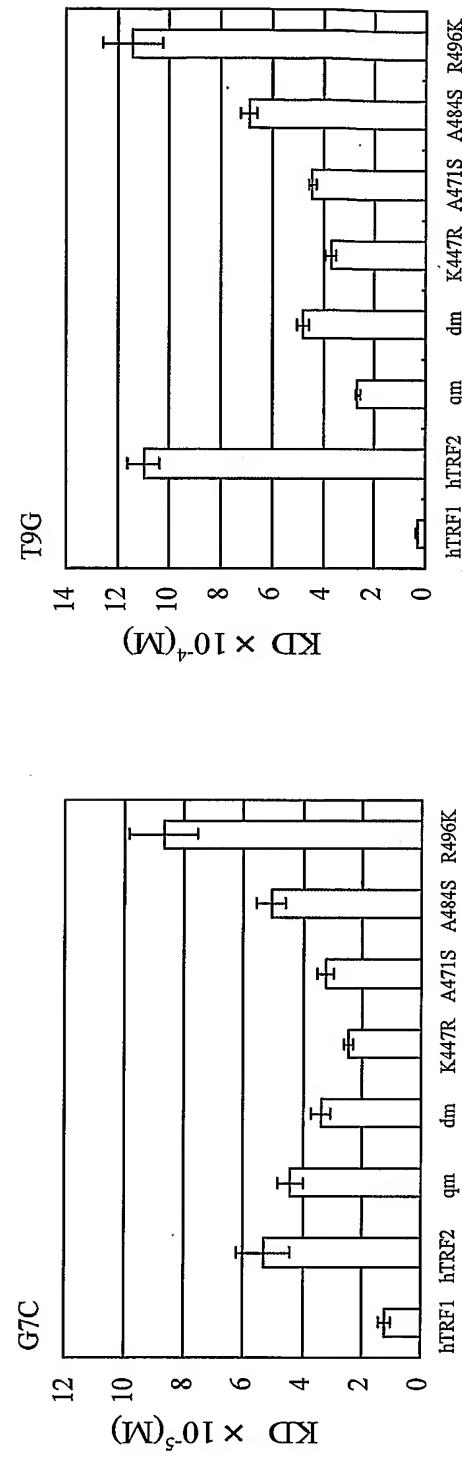
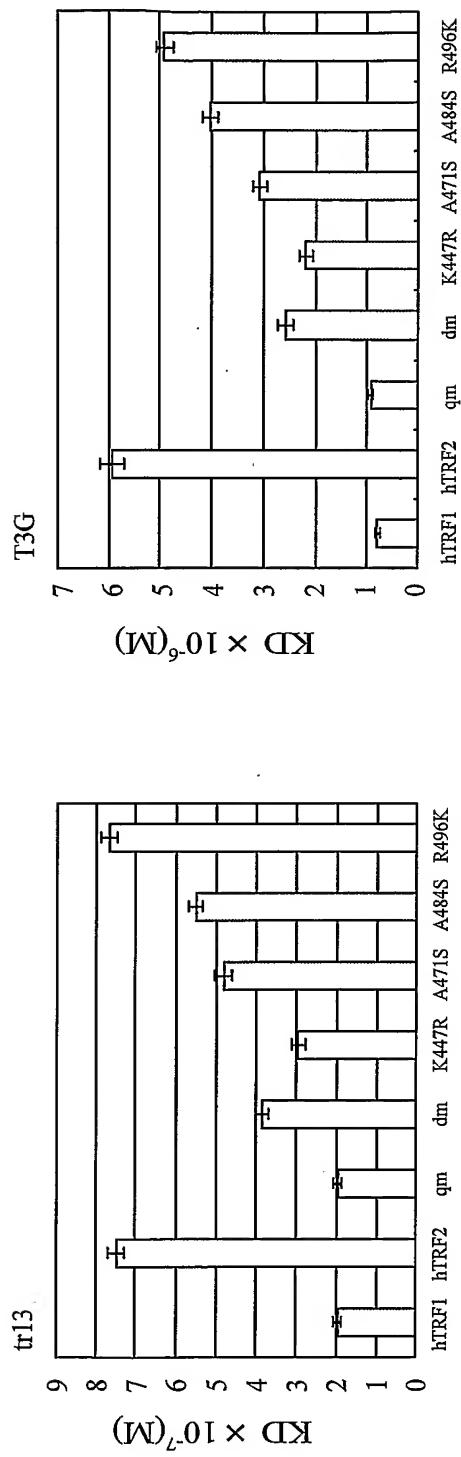


图 7

ERKRPTAESSEOLARIKRETNEN---RYLTERRRQOISSEIG---
QRSPRTIESASOLDTEERAERT---QYDITYTREELAORTN---
VRVIRTAFTDQLGRIEKETYKE---NYVSRRPRCELLAAQIN---
RKRGROTITYTRYOTLEKEEHEN---RYLTERRRRIELAHALS---
SKRTRQITTRYOTLEKEEHEN---RYTERRRIDIANALS---
RKRBKVLTKAQTYELLERRQO---RYLSAPERELLASTLIR---
GRNRREKGTPASQOILFOAMVERO---KNPSKEERETLYECNRRAECJORGVSPSOAQIGSNLIVTEBVYNWEANRKEEAFRHKLAMDITYKLN
RRKRRTVILESOAQVYELLERKQO---KYLsapereHlasmH---
KRKRRTTISIAAKDALLERHEGEH---SKPSSQEIMRMAEIN---
NRKRPTIEFTIAQLLAERKROK---QVLSIAERAEEFSSSLS---
SPKGKSSSISDQARAFLEEVRK---QSILNSKEKEEVAKRCG---
KPYRGHRETFKENVRVILESMAKNIENPILDTKGLENLMENTS---
TTVRTVTLNERQLHTTTCQAAN---PPRDALMKEQIYMIG---
RRRKRTSIEETNIRVALEKSTLEN---QPKTSEEITMADQIN---
RRRKRTSIEETNVRALEKSLEN---QPKTSEEILLIAEQLH---
PSGLRTNETTROLTEKEEHEN---KYLsARRVEIAATLE---
ARRKRPTINKQATEIINEYVSHLSNPYSEEAKKEELAKKCG---
I NEAQJKIWIFQNKRKAKIKKS
I TEARIQWIFQNRRARLRQKQHTSVS
I PEESTIKIWIFQNRMKMDKQR
I TERQJKIWIFQNRMKWKKENKTKGEPG
I SERQJKIWIFQNRMKSKKDRLDSSPEH
I LPTQJKIWIFQNHYKTKRAQNEKGYEGHP
VND- Nk 2
LFB1/HFN1 因子
チロイド転写因子
Pi t-1
MS X-1
MATa1
MAT a 2
I ns
OCT - 1
OCT - 2
OCT - 4
HOX - B1
pbx-1

SEQUENCE LISTING

<110> Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences
City of Yokohama

<120> TRF2 DNA-binding domain mutant proteins, telomeric DNA mutants, and use of a structure of a complex between a TRF2 DNA binding domain and a double-stranded DNA molecule

<130> FP-047PCT

<140>

<141>

<150> JP P2004-046238

<151> 2004-02-23

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 189

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(189)

<223>

<400> 1

gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
20 25 30

tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
50 55 60

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 3

<211> 189

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(189)

<223>

<400> 3

gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa agg cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
 Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 4

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 4

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 5
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(189)
 <223>

<400> 5
 gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

tgg tct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca gct gtg 144
 Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 6

<211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 6

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 7
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(189)
 <223>

<400> 7
 gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca tct gtg 144
 Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 8
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 8

Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Lys	Lys	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Glu
1				5				10				15			

Glu	Ser	Glu	Trp	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Glu	Gly	Asn
				20				25				30			

Trp	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Asn	Tyr	Pro	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Ser	Val
					35		40				45				

Met	Ile	Lys	Asp	Arg	Trp	Arg	Thr	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Asn
					50		55			60				

<210> 9
<211> 189
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(189)
<223>

<400> 9																
gaa	gac	agt	aca	acc	aat	ata	aca	aaa	aag	cag	aag	tgg	act	gta	gaa	
Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Lys	Lys	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Glu	48
1				5				10				15				

gaa	agg	gag	tgg	gtc	aag	gct	gga	gtg	cag	aaa	tat	ggg	gaa	gga	aac	
Glu	Ser	Glu	Trp	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Glu	Gly	Asn	96
					20			25				30				

tgg	gct	gcc	att	tct	aaa	aat	tac	cca	ttt	gtt	aac	cga	aca	gct	gtg	
Trp	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Asn	Tyr	Pro	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Ala	Val	144
					35		40			45						

atg att aag gat cgc tgg cg acc atg aaa aag ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 10
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 10

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ala Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 11
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(189)
 <223>

<400> 11
 gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa agg cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

tgg tct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca tct gtg 144

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aag ctt ggc atg aac 189
 Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 12

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Arg Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn
 20 25 30

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val
 35 40 45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Lys Leu Gly Met Asn
 50 55 60

<210> 13

<211> 189

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(189)

<223>

<400> 13

gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag aag tgg act gta gaa 48
 Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu
 1 5 10 15

gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa tat ggg gaa gga aac 96
 Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn

20	25	30	
----	----	----	--

tgg tct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt aac cga aca tct gtg	144		
Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val			
35	40	45	

atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga ctt ggc atg aac	189		
Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn			
50	55	60	

<210> 14

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln Lys Trp Thr Val Glu			
1	5	10	15

Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys Tyr Gly Glu Gly Asn		
20	25	30

Trp Ser Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val Asn Arg Thr Ser Val		
35	40	45

Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg Leu Gly Met Asn		
50	55	60

<210> 15

<211> 1500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1500)

<223>

<400> 15

atg gcg gga gga ggc ggg agt agc gac ggc agc ggg cgg gca gct ggc	48		
Met Ala Gly Gly Gly Ser Ser Asp Gly Ser Gly Arg Ala Ala Gly			
1	5	10	15

agg cgg gcg tcc cgc agt agc ggg cgg gcc cgg cgg ggg cgc cac gag	96
Arg Arg Ala Ser Arg Ser Gly Arg Ala Arg Arg Gly Arg His Glu	

20	25	30	
ccg ggg ctg ggg ggc ccg gcg gag cgc ggc gcg ggg gag gca cgg ctg Pro Gly Leu Gly Gly Pro Ala Glu Arg Gly Ala Gly Glu Ala Arg Leu	35 40 45		144
gaa gag gca gtc aat cgc tgg gtg ctc aag ttc tac ttc cac gag gcg Glu Glu Ala Val Asn Arg Trp Val Leu Lys Phe Tyr Phe His Glu Ala	50 55 60		192
ctg cgg gcc ttt cgg ggt agc cgg tac ggg gac ttc aga cag atc cgg Leu Arg Ala Phe Arg Gly Ser Arg Tyr Gly Asp Phe Arg Gln Ile Arg	65 70 75 80		240
gac atc atg cag gct ttg ctt gtc agg ccc ttg ggg aag gag cac acc Asp Ile Met Gln Ala Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Lys Glu His Thr	85 90 95		288
gtg tcc cga ttg ctg cgg gtt atg cag tgt ctg tcg cgg att gaa gaa Val Ser Arg Leu Leu Arg Val Met Gln Cys Leu Ser Arg Ile Glu Glu	100 105 110		336
ggg gaa aat tta gac tgt tcc ttt gat atg gag gct gag ctc aca cca Gly Glu Asn Leu Asp Cys Ser Phe Asp Met Glu Ala Glu Leu Thr Pro	115 120 125		384
ctg gaa tca gct atc aat gtg ctg gag atg att aaa acg gaa tti aca Leu Glu Ser Ala Ile Asn Val Leu Glu Met Ile Lys Thr Glu Phe Thr	130 135 140		432
ctg aca gaa gca gtg gtc gaa tcc agt aga aaa ctg gtc aag gaa gct Leu Thr Glu Ala Val Val Glu Ser Ser Arg Lys Leu Val Lys Glu Ala	145 150 155 160		480
gct gtc att att tgt atc aaa aac aaa gaa ttt gaa aag gct tca aaa Ala Val Ile Ile Cys Ile Lys Asn Lys Glu Phe Glu Lys Ala Ser Lys	165 170 175		528
att ttg aaa aaa cat atg tcc aag gac ccc aca act cag aag ctg aga Ile Leu Lys Lys His Met Ser Lys Asp Pro Thr Thr Gln Lys Leu Arg	180 185 190		576
aat gat ctc ctg aat att att cga gaa aag aac ttg gcc cat cct gtt Asn Asp Leu Leu Asn Ile Ile Arg Glu Lys Asn Leu Ala His Pro Val	195 200 205		624
atc cag aac ttt tca tat gag acc ttc cag cag aag atg ctg cgc ttc Ile Gln Asn Phe Ser Tyr Glu Thr Phe Gln Gln Lys Met Leu Arg Phe	210 215 220		672
ctg gag agc cac ctg gat gac gcc gag ccc tac ctc ctc acg atg gcc Leu Glu Ser His Leu Asp Asp Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Thr Met Ala	225 230 235 240		720

aaa aag gct ttg aaa tct gag tcc gct gcc tca agt aca ggg aag gaa Lys Lys Ala Leu Lys Ser Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Glu 245 250 255	768
gat aaa cag cca gca cca ggg cct gtg gaa aag cca ccc aga gaa ccc Asp Lys Gln Pro Ala Pro Gly Pro Val Glu Lys Pro Pro Arg Glu Pro 260 265 270	816
gca agg cag cta cgg aat cct cca acc acc att gga atg atg act ctg Ala Arg Gln Leu Arg Asn Pro Pro Thr Thr Ile Gly Met Met Thr Leu 275 280 285	864
aaa gca gct ttc aag act ctg tct ggt gca cag gat tct gag gca gcc Lys Ala Ala Phe Lys Thr Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ser Glu Ala Ala 290 295 300	912
ttt gca aaa ctg gac cag aag gat ctg gtt ctt cct act caa gct ctc Phe Ala Lys Leu Asp Gln Lys Asp Leu Val Leu Pro Thr Gln Ala Leu 305 310 315 320	960
cca gca tca cca gcc ctc aaa aac aag aga ccc aga aaa gat gaa aac Pro Ala Ser Pro Ala Leu Lys Asn Lys Arg Pro Arg Lys Asp Glu Asn 325 330 335	1008
gaa agt tca gcc ccg gct gac ggt gag ggt ggc tcg gaa ctg cag ccc Glu Ser Ser Ala Pro Ala Asp Gly Glu Gly Ser Glu Leu Gln Pro 340 345 350	1056
aag aac aag cgc atg aca ata agc aga ttg gtc ttg gag gag gac agc Lys Asn Lys Arg Met Thr Ile Ser Arg Leu Val Leu Glu Glu Asp Ser 355 360 365	1104
cag agt act gag ccc agc gca ggc ctc aac tcc tcc cag gag gcc gct Gln Ser Thr Glu Pro Ser Ala Gly Leu Asn Ser Ser Gln Glu Ala Ala 370 375 380	1152
tca gcg cca cca tcc aag ccc acc gtt ctc aac caa ccc ctc cct gga Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Leu Asn Gln Pro Leu Pro Gly 385 390 395 400	1200
gag aag aat ccc aaa gta ccc aaa ggc aag tgg aac agc tct aat ggg Glu Lys Asn Pro Lys Val Pro Lys Gly Lys Trp Asn Ser Ser Asn Gly 405 410 415	1248
gtt gaa gaa aag gag act tgg gtg gaa gag gat gaa ctg ttt caa gtt Val Glu Glu Lys Glu Thr Trp Val Glu Glu Asp Glu Leu Phe Gln Val 420 425 430	1296
cag gca gca cca gat gaa gac agt aca acc aat ata aca aaa aag cag Gln Ala Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln 435 440 445	1344
aag tgg act gta gaa gaa agc gag tgg gtc aag gct gga gtg cag aaa Lys Trp Thr Val Glu Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys	1392

450	455	460	
tat ggg gaa gga aac tgg gct gcc att tct aaa aat tac cca ttt gtt Tyr Gly Glu Gly Asn Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val			1440
465	470	475	480
aac cga aca gct gtg atg att aag gat cgc tgg cgg acc atg aaa aga Asn Arg Thr Ala Val Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg			1488
485		490	495
c _{ttt} ggc atg aac Leu Gly Met Asn			1500
500			
<210> 16			
<211> 500			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 16			
Met Ala Gly Gly Gly Ser Ser Asp Gly Ser Gly Arg Ala Ala Gly			
1	5	10	15
Arg Arg Ala Ser Arg Ser Ser Gly Arg Ala Arg Arg Gly Arg His Glu			
20		25	30
Pro Gly Leu Gly Gly Pro Ala Glu Arg Gly Ala Gly Glu Ala Arg Leu			
35		40	45
Glu Glu Ala Val Asn Arg Trp Val Leu Lys Phe Tyr Phe His Glu Ala			
50		55	60
Leu Arg Ala Phe Arg Gly Ser Arg Tyr Gly Asp Phe Arg Gln Ile Arg			
65		70	80
Asp Ile Met Gln Ala Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Lys Glu His Thr			
85		90	95
Val Ser Arg Leu Leu Arg Val Met Gln Cys Leu Ser Arg Ile Glu Glu			
100		105	110
Gly Glu Asn Leu Asp Cys Ser Phe Asp Met Glu Ala Glu Leu Thr Pro			
115		120	125

Leu Glu Ser Ala Ile Asn Val Leu Glu Met Ile Lys Thr Glu Phe Thr
130 135 140

Leu Thr Glu Ala Val Val Glu Ser Ser Arg Lys Leu Val Lys Glu Ala
145 150 155 160

Ala Val Ile Ile Cys Ile Lys Asn Lys Glu Phe Glu Lys Ala Ser Lys
165 170 175

Ile Leu Lys Lys His Met Ser Lys Asp Pro Thr Thr Gln Lys Leu Arg
180 185 190

Asn Asp Leu Leu Asn Ile Ile Arg Glu Lys Asn Leu Ala His Pro Val
195 200 205

Ile Gln Asn Phe Ser Tyr Glu Thr Phe Gln Gln Lys Met Leu Arg Phe
210 215 220

Leu Glu Ser His Leu Asp Asp Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Thr Met Ala
225 230 235 240

Lys Lys Ala Leu Lys Ser Glu Ser Ala Ala Ser Ser Thr Gly Lys Glu
245 250 255

Asp Lys Gln Pro Ala Pro Gly Pro Val Glu Lys Pro Pro Arg Glu Pro
260 265 270

Ala Arg Gln Leu Arg Asn Pro Pro Thr Thr Ile Gly Met Met Thr Leu
275 280 285

Lys Ala Ala Phe Lys Thr Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ser Glu Ala Ala
290 295 300

Phe Ala Lys Leu Asp Gln Lys Asp Leu Val Leu Pro Thr Gln Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Ser Pro Ala Leu Lys Asn Lys Arg Pro Arg Lys Asp Glu Asn
325 330 335

Glu Ser Ser Ala Pro Ala Asp Gly Glu Gly Gly Ser Glu Leu Gln Pro
340 345 350

Lys Asn Lys Arg Met Thr Ile Ser Arg Leu Val Leu Glu Glu Asp Ser
355 360 365

Gln Ser Thr Glu Pro Ser Ala Gly Leu Asn Ser Ser Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Ser Ala Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Leu Asn Gln Pro Leu Pro Gly
385 390 . 395 400

Glu Lys Asn Pro Lys Val Pro Lys Gly Lys Trp Asn Ser Ser Asn Gly
405 410 415

Val Glu Glu Lys Glu Thr Trp Val Glu Glu Asp Glu Leu Phe Gln Val
420 425 430

Gln Ala Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Thr Asn Ile Thr Lys Lys Gln
435 440 445

Lys Trp Thr Val Glu Glu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Val Gln Lys
450 455 460

Tyr Gly Glu Gly Asn Trp Ala Ala Ile Ser Lys Asn Tyr Pro Phe Val
465 470 475 480

Asn Arg Thr Ala Val Met Ile Lys Asp Arg Trp Arg Thr Met Lys Arg
485 490 495

Leu Gly Met Asn
500

<210> 17
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 17
gttagggta ggg

<210> 18
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 18
ccctaaccct aac

13

<210> 19
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 19
gtgagggtta ggg

13

<210> 20
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 20
gtttaggctta ggg

13

<210> 21
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 21
gtttagggtga ggg

13

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

ggtctcgcat atggaagaca gtacaaccaa tataac

36

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

gcgggaattc tcagttcatg ccaagtcttt tc

32

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24

ggaaacttgtt ctgccatttc taaaaat

27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

agaaatggca gaccagtttc cttcccc

27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 26

aaccgaacat ctgtgatgat taaggat

27

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 27
aatcatcaca gatgttcggtaacaaa

27

<210> 28
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 28
ggtctcgcat atggaagaca gtacaaccaa tataacaaaa aggcagaagt gg

52

<210> 29
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 29
ggaattctca gttcatgcga agtttttca tggtccg

37